

THESIS

TÜBINGEN

1967

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. H. Roemer

---

Zur Beeinflussung der unspezifischen „sauren“ und  
„alkalischen“ Phosphatasen sowie der Lactatdehydrogenase  
in verschiedenen Meerschweinchenorganen  
durch den Kallikreinaktivator

LANE MEDICAL LIBRARY  
STANFORD UNIVERSITY  
300 PASTEUR DRIVE  
PALO ALTO, CALIF.

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin  
einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

HANS-JOACHIM REIMERS

aus Bonn

8919



Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen

Direktor: Prof. Dr. H. Roemer

---

Zur Beeinflussung  
der unspezifischen "sauren" und "alkalischen"  
Phosphatasen  
sowie der Lactatdehydrogenase  
in verschiedenen Meerschweinchenorganen  
durch den Kallikreinaktivator

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin  
einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Hans-Joachim Reimers  
aus Bonn

1967

Dekan: Prof. Dr. W. Schneider

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. G. Jung

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Roemer

Meinen Eltern

Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Jung danke  
ich herzlich für die freundliche Über-  
lassung des Themas dieser Arbeit;  
ein besonderer Dank gilt Herrn Dr.  
E. Kidess für die wissenschaftliche  
Betreuung und viele gute Ratschläge.

## G L I E D E R U N G

1. EINLEITUNG
  - 1.1. Charakterisierung des Kallikreinaktivators
  - 1.2. Klinische Anwendung des Kallikreinaktivators
  - 1.3. Fragestellung
2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN
  - 2.1. Versuchsanordnung
    - 2.1.1. Einengung der Fragestellung
    - 2.1.2. Versuchsbedingungen
    - 2.1.3. Versuchsgang
  - 2.2. Methodik
    - 2.2.1. Gewinnung der Organe
    - 2.2.2. Herstellung des Homogenats
    - 2.2.3. Bestimmung der Enzymaktivitäten
    - 2.2.4. Statistische Auswertung
  - 2.3. Eigene Ergebnisse
    - 2.3.1. Vorbemerkungen
    - 2.3.2. Auszüge aus den Versuchsprotokollen und ihre Auswertung
    - 2.3.3. Zusammenfassung der Versuchsergebnisse
3. DISCUSSION: Theoretische Möglichkeiten der Inhibition durch den Kallikreinaktivator bezüglich der
  - 3.1. Alkalischen Phosphatasen
  - 3.2. Sauren Phosphatasen
  - 3.3. Lactatdehydrogenase
4. Zusammenfassung
5. Literaturverzeichnis

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Charakterisierung des Kallikreininaktivators

1928 wiesen KRAUT, FREY und BAUER (42) im Blut einen Kallikreininaktivator nach. Er wurde später ebenfalls in verschiedenen tierischen und menschlichen Organen gefunden. Der in größerer Menge aus der Rinderparotis extrahierte Inaktivator ist vor allem unter der Warenbezeichnung "TRASYL" (R) bekannt. (13)

Es handelt sich um ein basisches Polypeptid mit einem Molekulargewicht zwischen 11 und 12000 (KRAUT u.a. 44). 16 verschiedene Aminosäuren bilden eine Kette, die aus insgesamt 100 Aminosäureresten besteht (SCHULTZ u.a. 80; 13). Der Kallikreininaktivator hemmt physiologischerweise den größten Teil des im Blute kreisenden Kallikreins, eines proteolytischen Enzyms, das die Aktivierung der Kininogene zu den gefäßaktiven Kininen steuert (KRAUT, FREY, WERLE, 43). Diese Hemmung ist reversibel (FREY, KRAUT, 29).

Außerdem setzt der Inaktivator die Aktivität von Trypsin sowie Chymotrypsin herab (WERLE, MAIER, RINGELMANN, 87; KOSLOWSKI, 41), hemmt die Aktivierung von Profibrinolysin zu Fibrinolysin kompetitiv und verhindert den proteolytischen Abbau von Fibrinogen und Fibrin (STEICHELE u. HERSCHLEIN, 82). DRÄGER und JUNG (25) konnten im in-vivo-Versuch eine Inhibierung der Endopeptidasen in Leber, Niere und Lunge des Meerschweinchens nachweisen. Dagegen fanden JUNG und HASSAN (37 B) bei dem gleichen Versuchstier keine statistisch verifizierbare Wirkung auf die Glycyl-Glycin-Dipeptidase und die unspezifische Leucinaminopeptidase.

### 1.2. Klinische Anwendung des Kallikreininaktivators

Als Trypsininhibitor wird Trasylol (R) bei akuten Pankreatitiden (FREY, 30), akuter Pankreasnekrose (MILOSEVIC, 58) und chronisch rezidivierender Pankreatitis (GIRARD, 31) an-

gewendet.

Bei der autodigestiven tryptischen Pankreatitis gelangen mit den übrigen Fermenten auch Trypsin und aktives Kallikrein ins Blut. Eine zusätzliche Aktivierung des Blutkallikreins durch die freigesetzten Proteasen führt rasch zu Blutdrucksenkung und Kreislaufkollaps als gefürchtigem Begleitsymptom der akuten Pankreasnekrose (FORELL, 27). Trasylol (R) übt therapeutisch zwar keinen Einfluß auf die normale Fermentbildung aus, bindet aber das ausgeschüttete Kallikrein und Trypsin sofort ab, so daß dieses seine Wirkung nicht mehr voll entfalten kann (FORELL, 28).

BENZER (15) gelang es, bei der unspezifischen postoperativen Parotitis ebenfalls ein proteolytisches Enzym nachzuweisen. Er konnte damit die Schmieden'sche Theorie der Fermententgleisung als ursächlichem pathogenetischen Faktor bestätigen. Trasylol (R) inhibiert dieses Ferment und wird mit Erfolg therapeutisch eingesetzt (LORBEEK, 50).

Nach Weichteilverletzungen, Verbrennungen und Operationstraumen wird eine pathologische Aktivierung des proteolytischen Potentials im Blut beobachtet. Abschwächung einiger Gerinnungsfaktoren, Steigerung der Kapillarpermeabilität, Auflösung der Thromben und eine Verbrauchsafibrinogenämie sind die Folge. Die resultierende Blutungsneigung kann durch eine Plasminhemmung mit Hilfe des Kallikreininaktivators wirksam bekämpft werden (52).

Da Trasylol (R) das Proteolyse-Stress-Geschehen abmildert oder ganz unwirksam macht, verwendet MARGGRAF (53) den Inaktivator zur kurzfristigen Stabilisierung von Blutkonserven.

In der Dermatologie hat sich Trasylol (R) als Transplantationsschutz (BERTELLI, 16) und bei allergischer Dermatitis (KLASCHKA, 39) als wirksam erwiesen.

### 1.3. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob der Kallikreinaktivator neben den genannten proteolytischen Enzymen auch Fermente des Kohlenhydratstoffwechsels beeinflußt.

Bei der Anwendung von Trasylol (R) sind in seltenen Fällen Unverträglichkeitsreaktionen auf allergischer Basis bekannt geworden (13). Regelmäßig auftretende pharmakologische Nebeneffekte wurden nicht beobachtet (MAURER, 56). Aus klinischer Sicht ergeben sich deshalb bisher keine entscheidenden Anhaltspunkte für die Prüfung bestimmter Enzyme.

Trotzdem liegen einige Arbeiten über die Wirkung des Kallikreinaktivators auf Fermente des nicht proteolytischen Stoffwechsels vor: SCHULTIS und RICK (78) beschreiben u.a. eine Hemmung der Pankreassekretion von Amylase, Lipase und der  $\alpha$ -Carboxypeptidase. Eine Aktivitätsminderung der genannten Enzyme in vitro konnten die Autoren nicht nachweisen. MÜLLER\_WIELAND (60) berichtet, daß neben der Diastase auch die Serum-Glykogenase durch Trasylol (R) unbeeinflußt bleibt. Dagegen fanden SAMEJIMA und Mitarbeiter (74) eine auffallende Hemmung der alkalischen Serum-Phosphatase von Hunden, die nach artefiziell erzeugter Pankreasnekrose mit dem Kallikreinaktivator behandelt worden waren.

Wir führten unsere Versuche aus diesem Grund ebenfalls mit den unspezifischen alkalischen Phosphatasen, zusätzlich mit den sauren Phosphatasen und der Lactatdehydrogenase aus verschiedenen Geweben des Meerschweinchens durch. Die genannten Enzyme zeichnen sich u.a. durch ihre ubiquitäre Verbreitung aus, die Phosphatasen daneben durch ihr großes Wirkungsspektrum. Das klinische Interesse dieser Fermente beruht auf einer charakteristischen Verschiebung des Blutserumspiegels bei einigen Erkrankungen wie Knochenaffektionen, Verschlußikterus, Prostatacarcinom, Hepatitis oder Herzinfarkt.

## 2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

### 2.1. Versuchsanordnung

#### 2.1.1. Einengung der Fragestellung

Die Frage, die durch die vorliegende Arbeit beantwortet werden sollte, lautet:

"Inhibiert Trasylol (R) in humantherapeutischer Dosis die alkalischen oder sauren Phosphatasen bzw. die Lactatdehydrogenasen in Leber, Lunge oder Niere des Meerschweinchens?"

Diese Spezifizierung der Aufgabenstellung ist aus mehreren Gründen erforderlich:

- a.) Die alkalischen bzw. sauren Phosphatasen stellen kein einheitliches Enzym dar. Es handelt sich um sogenannte isodyname Fermente, die zwar die gleiche Substratspezifität haben, aber ein unterschiedliches pH-Optimum besitzen und ein differentes Verhalten gegenüber gewissen Zusätzen zeigen (ROCHE u. THOAI, 72; BAMANN u.a., 11).

PFLEIDERER, WIELAND u.a. (89) wiesen nach, daß sich die physikalischen Eigenschaften der aus verschiedenen Organen isolierten Lactatdehydrogenasen nicht decken.

Dies muß nach neueren Arbeiten (KAPLAN u. Mitarb., 20; MARKERT, 55) auf einen unterschiedlichen Aufbau der sogenannten Isozyme bezogen werden.

Theoretisch kann deswegen nicht ohne weiteres in differenten Organen ein gleichsinniges Verhalten gegenüber Effektoren erwartet werden.

- b.) Im Gegensatz zur Reagenzglasreaktion ist der in-vivo-Versuch weder exakt steuerbar, noch in allen Einzelheiten zu übersehen. Eine direkte oder indirekte, eventuell von Organ zu Organ verschiedene Beeinflussung durch gewebeeigenständige Stoffe - wie Hormone, Hemmstoffe, Antihemmstoffe - muß erwogen werden (vgl. DIRSCHERL u. AMMON, 24; ABDERHALDEN, 1; LUNDQUIST, 51; OHLMEYER, 64; ROSENKUND, 73).

Ergebnisse haben deshalb nur für die betreffenden Organe des verwendeten Versuchstieres uneingeschränkt Gültigkeit.

- c.) Eine Effektorwirkung kann Dosisabhängig sein. Es ist also erforderlich, eine Prüfdosis festzulegen. Dabei muß berücksichtigt werden, daß der Trasylolspiegel nach erfolgter Injektion in Abhängigkeit von der Zeit und dem Gewebe außerordentlich stark schwankt (vgl. TRAUTSCHOLD u. WERLE, 88).

### 2.1.2. Versuchsbedingungen

Die Fragestellung erfordert, daß

- a.) bei der gewählten Versuchsanordnung in den untersuchten Organhomogenaten ein charakteristischer, in gewissen Grenzen constanter "Normenzymspiegel" nachweisbar ist.
- b.) nach Injektion des Trasylols (R) zum Zeitpunkt der Fermentaktivitätsmessung ein spezifischer, reproduzierbarer Kallikreininaktivatorspiegel in den betreffenden Organhomogenaten vorhanden ist.
- c.) Es wird weiter unten gezeigt, daß das Trasylol (R) nicht intravenös appliziert werden kann. Wir müssen deshalb zusätzlich fordern, daß sich der Inaktivatorspiegel- unabhängig von der Applikationsform - mit dem nach intravenöser Injektion einer humantherapeutischen Dosis auftretenden Serum- bzw. Gewebespiegel des Trasylols (R) in Beziehung setzen läßt.

### 2.1.3. Diese Bedingungen wurden durch folgenden Versuchsgang erfüllt

- ad a.) Zur Bestimmung des Normenzymspiegels in Leber, Lunge und Niere wurden nur Tiere desselben Stammes herangezogen, da KOCHAKIAN und FOX (40) darauf hin-

gewiesen haben, daß Enzymaktivitäten von Stamm zu Stamm variieren können. SULKIN und GARDNER (83) beschreiben sogar Aktivitätsdifferenzen zwischen den einzelnen Leberregionen ihrer Versuchstiere. Wir suchten diese Fehlermöglichkeit durch Homogenisierung der gesamten Organe zu umgehen.

- ad b.) TRAUTSCHOLD und WERLE (88) haben in Niere und Leber den höchsten Inaktivatorspiegel nach Injektion von Trasylol (R) gemessen. Wir führten unsere eigenen Versuche deswegen mit Enzymen dieser Organe durch. Parallelbestimmungen wurden vergleichsweise mit Lungenhomogenat angesetzt.

Die genannten Autoren berichten in der selben Arbeit, daß im Hundeversuch nach intravenöser Applikation von 1000 KIE/kg<sup>+</sup> ein Anfangsblutserumspiegel von 15 KIE/ml auftritt, der nach 1 Stunde auf 4 KIE/ml und nach 5 Stunden auf 1 KIE/ml abgesunken ist.

Es darf also erwartet werden, daß die untersuchten Organe mindestens bis 5 Stunden nach Injektion des Kallikreininaktivators einen zwar zeitabhängigen, aber charakteristischen Trasylolspiegel aufweisen. Auf Grund dessen wurden die Organhomogenate 1/2 - 5 Stunden nach Applikation des Inaktivators hergestellt.

- ad c.) Bei der Wahl der Applikationsform und der Bestimmung der Trasyloldosis gingen wir wiederum von den Befunden Trautschold's und Werle's am Hund aus.

Eine intravenöse Injektion des Trasylols stößt auf erhebliche Schwierigkeiten: Die Blutgefäße des

---

<sup>+</sup> Eine Kallikreininaktivatoreinheit (KIE) ist diejenige Menge Inaktivator, die 2 Kallikreineinheiten in 1 Stunde bei pH=8 und 37°C zur Hälfte zu inaktivieren vermag.

Meerschweinchens lassen sich nur schwer auffinden und besitzen zudem ein sehr enges Lumen. Bei einem Gesamtblutvolumen von etwa 50 ml bedeutet die parenterale Zufuhr der notwendigen 10 ml Injektionsflüssigkeit eine erhebliche Belastung von Kreislauf und Blutgefäßsystem, sofern man von einer Tropinfusion absieht.

Auf Grund der Versuche der erwähnten Autoren bietet sich statt dessen die intraperitoneale Applikation an. Bei Anwendung dieser Methodik muß aber in Rechnung gestellt werden, daß die maximale Serumkonzentration erst nach 90 Minuten erreicht wird und etwa 5 mal niedriger liegt als der sofort nach der intravenösen Injektion einer gleichen Dosis gemessene Serumspegel. Andererseits werden insgesamt 75 % des verabreichten Kallikreinaktivators im Blut nachweisbar, wenn man die Konzentration über die Zeit integriert.

Aus diesen Angaben versuchten wir näherungsweise die notwendige Dosis für unsere eigenen Versuche zu ermitteln: Die intraperitoneal verabreichte Kallikreinaktivatormenge soll die gleiche maximale Blut- und damit auch die gleiche Gewebekonzentration aufbauen, wie sie nach intravenöser Injektion einer humantherapeutischen Dosis auftreten würde.

(Wir setzen voraus, daß im Bereich der von uns angewendeten Dosis das zeitabhängige Verhältnis von Resorption zu Ausscheidung bzw. Abbau des Trasylols (R) im Meerschweinchenversuch genauso groß ist, wie es von TRAUTSCHOLD und WERLE (88) im Hundeversuch bei einer geringeren Dosis experimentell festgelegt wurde. Unter dieser Bedingung können wir ebenfalls einen maximalen Spiegel des Kallikreinaktivators 90 Minuten nach der Injektion erwarten. Eine exakte Imitierung des nach intravenöser Injektion in den

einzelnen Organen auftretenden Inaktivatorspiegels würde zudem erfordern, daß bis zum Erreichen des maximalen Blutserumspiegels Abbau und Ausscheidung von Trasylol (R) in Leber und Niere die Resorption aus der Bauchhöhle quantitativ wesentlich über treffen.

Wir hatten nicht die Möglichkeit, experimentell den notwendigen Aufschluß zu gewinnen.)

Die übliche therapeutische Dosis schwankt zwischen 500 und 1000 KIE/kg/die und liegt beim Menschen maximal in der Größenordnung von 100.000 KIE/die. Unterstellen wir, daß das Trasylol (R) als Eiweißkörper vorwiegend im Serum verteilt wird, so können wir einen größten Anfangsspiegel von 100.000/3000 (KIE/ml) errechnen (5l Blut; Hämatokrit 60:40). Es sei erwähnt, daß TRAUTSCHOLD und WERLE experimentell 20-40 % niedrigere Werte gefunden haben.

Soll dieselbe Serumkonzentration beim Meerschweinchen erreicht werden, würde die notwendige intravenöse Dosis

$$\frac{100.000 \text{ KIE} \cdot 30 \text{ ml}}{3000 \text{ ml}} = 1000 \text{ KIE betragen.}$$

(Die Meerschweinchen wogen durchschnittlich 450 - 500 gr.

Das Serumvolumen beträgt also höchstens 30 ml.)

Bei intraperitonealer Applikation benötigen wir entsprechend den obigen Angaben die 5-fache Menge an Trasylol (R), um nach 90 Minuten dieselbe maximale Serumkonzentration zu erreichen. Wir haben die Fermentbestimmungen nicht im Serum, sondern in Organhomogenaten durchgeführt. Es muß deshalb zusätzlich berücksichtigt werden, daß das Verhältnis von Gesamtkörpergewicht zu Organgewicht bei Mensch und Tier unterschiedlich ist. Leber und Niere des Meerschweinchens sind relativ 3-mal schwerer als die

entsprechenden menschlichen Organe.

Formelmäßig läßt sich der Zusammenhang ausdrücken:

$$D = \frac{D_{ht} \cdot V_{SM} \cdot F_{ip} \cdot K_{OG}}{V_{SH}}$$

(Es entspricht:  $D$  = gesuchte Dosis;  $D_{ht}$  = humantherapeutische Dosis;  $V_{SM}$  = Serumvolumen des Meer-schweinchens;  $V_{SH}$  = Serumvolumen des Menschen;  $F_{ip}$  Faktor, der die Resorptionsverhältnisse sowie Abbau und Ausscheidung des Trasylols in Abhängigkeit von der Zeit und der verabreichten Dosis berücksichtigt;  $K_{OG}$  = Korrekturfaktor für die unterschiedliche Relation Körpergewicht zu Organgewicht).

Für unsere eigenen Versuche kann danach die Dosis auf etwa 15.000 KIE geschätzt werden.

Diese Angabe muß mit Vorsicht bewertet werden, da die Voraussetzungen der Berechnung nicht exakt bewiesen sind. So wurden die Faktoren  $F_{ip}$  und  $K_{OG}$  nicht experimentell festgelegt. Außerdem dürfen Ergebnisse vom Hund nicht ohne weiteres auf das Meer-schweinchen übertragen werden. Unter Berücksichtigung, daß wir gegenüber dem erwähnten Hundeversuch tatsächlich eine wesentlich höhere Dosis injiziert haben, dürfte die Formel eher zu große als zu kleine Werte liefern, da die Ausscheidungs- bzw. Abbaukapazität des Organismus stärker belastet wird.

Trotzdem möchten wir annehmen, daß die dargestellte Formel eine grobe Möglichkeit an die Hand gibt, die eingesetzte Dosis zu beurteilen. Dies ist umso mehr von Bedeutung, als wir nicht die errechnete "humantherapeutische" Dosis selbst, sondern 50.000 KIE injiziert haben. Diese Dosis wurde bereits bei ähnlichen Versuchen in unserem Labor angewendet (DRÄGER, 25) und entspricht somit etwa der 4-fachen humantherapeutischen Menge.

Zum Vergleich sollen in Tabelle 1 einige Dosisan-  
gaben nebeneinandergestellt werden.

Tab. 1: Vergleich einiger Trasylol (R)- Dosen

| SPEZIES              | BEMERKUNG                          | DOSIS                           |
|----------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| Mensch               | intravenöse Injektion              | 300-1500 KIE/kg                 |
| Meerschwein-<br>chen | Humantherapeutische<br>Dosis, i.v. | 1000-5000 KIE <sup>†</sup> /kg  |
| Meerschwein-<br>chen | humantherapeutische<br>Dosis, i.p. | 5000-25000 KIE <sup>†</sup> /kg |
| Maus                 | LD <sub>50</sub>                   | 2.000.000 KIE/kg                |
| Meerschwein-<br>chen | im Versuch, i.p.                   | 100.000 KIE/kg                  |

/ + theoretisch errechnet

Aus den vorangestellten Erörterungen ergibt sich so-  
mit folgender Versuchsgang:

- A. Bestimmung des Normenzymspiegels in Niere, Leber  
und Lunge des Meerschweinchens.
- B. Trasylolversuche
  - a.) 50.000 KIE werden intraperitoneal injiziert.
  - b.) In verschiedenen Versuchsreihen werden die  
Tiere 1/2, 1, 2, 3, bzw. 5 Stunden nach App-  
likation des Kallikreinaktivators getötet  
und sofort Organhomogenate hergestellt.
  - c.) Die Enzymaktivitäten werden bestimmt und mit  
den Normenzymspiegeln statistisch verglichen.

## 2.2. Methodik

### 2.2.1. Gewinnung der Organe

Wir hielten uns an das von JUNG, STEICHELE, HERSCHLEIN und DRÄGER (25) inaugurierte Verfahren. Bei intravitaler Durchspülung der Organe mit 5%-iger Glucoselösung werden relativ blutarme Präparate gewonnen. Eine stärkere Beeinflussung von Seiten der Serumenzyme wird dadurch vermieden.

In Äthernarkose wird die Bauchhöhle des Meerschweinchens eröffnet, und nach Durchtrennung einer großen Mesenterialvene eine fein ausgezogene Glascanüle in die vena cava inferior zwischen Zwerchfell und Leber eingestochen. Die Spülung selbst wird mit einem Besteck durchgeführt wie es zur Austauschtransfusion bei Neugeborenen Anwendung findet. Nach Perfusion von 300 - 400 ml Glucoselösung zeigt die Leber makroskopisch eine leicht gelbliche Tönung.

Die retrograde Spülung der Lunge erfolgt nach Eröffnung des Thorax vom linken Herz aus, das bis zu diesem Zeitpunkt arbeiten sollte. Die stoßweise Injektion von etwa 200 ml Flüssigkeit bläht die Lunge auf, die dadurch eine blaßweiße Farbe annimmt.

Die Niere wird erst nach ihrer Exstirpation über den Hilus gespült. Trotzdem werden auch hier sehr gleichmäßige Ergebnisse gewonnen.

Die Organe werden herausgenommen, unter ständiger Eiskühlung gehalten und der sofortigen Homogenisierung zugeführt.

Es soll noch bemerkt werden, daß bei der angewendeten Spülmethode jeweils 4 - 6% Blutstickstoff in den Organhomogenaten nachzuweisen war. (Er wurde aus der nach der Methode von DRABKIN photometrisch bestimmten Hämoglobinkonzentration im Homogenat errechnet.) Die Enzymaktivitäten der Phosphatasen und der Lactatdehydrogenase (LDH) sind im Blut aber sehr viel geringer als in den untersuchten Organen. Es muß deshalb damit gerechnet werden,

daß die gemessenen Werte durchschnittlich 3 - 5 % zu niedrig bestimmt wurden.

### 2.2.2. Herstellung des Homogenats

Hier hielten wir uns im wesentlichen an die von LANG und SIEBERT (47) angegebene Methodik. Die Organe wurden gewogen, anschließend unter Eiskühlung möglichst klein zerschnitten und unter Zusatz von 0,9%-iger Kochsalzlösung im Glashomogenisator nach POTTER-ELVEHJEM zu einem 1:5 Homogenat verarbeitet. Dieses wurde bei 2000 g 30 Minuten lang zentrifugiert. Dadurch wird eine Enzymlösung gewonnen, die weitgehend von Zellkernen, einzelnen Zellen und kleineren Zellverbänden frei ist.

### 2.2.3. Bestimmung der Enzymaktivitäten

#### 2.2.3.1. Die Phosphatasen

Die Bestimmung der sauren Phosphatasen wurde nach der Methodik von LONDON und HUDSON (49), die der alkalischen Phosphatasen nach JENNER und KAY (36) durchgeführt. Man läßt die enzymhaltige Lösung auf  $\text{Na}_2\text{-}\beta\text{-Glycerophosphat}$  als Substrat einwirken und mißt den Zuwachs an anorganischem Phosphat im Ansatz.

##### 2.2.3.1.1. Saure Phosphatase

Die Bestimmung erfolgt bei pH=5 in einem 0,2 m Essigsäure-Acetat-Puffer unter Zusatz von Magnesiumjonen (vgl. ABUL-FADL und KING, 2 sowie CURTOIS und PERLES, 22). 410 mg  $\text{MgCl}_2$  und 500 mg  $\text{Na}_2\text{-}\beta\text{-Glycerophosphat}$  werden in etwas Wasser gelöst. Nach Zugabe von 80 ml Essigsäure-Acetat-Puffer wird die Lösung mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 ml aufgefüllt.

Ansatz: 4 ml Puffer - Substratlösung

1 ml Enzymlösung

Nach einer Incubationszeit von 20 bzw. 45 Minuten bei 37°C

wurde die Reaktion mit 1 ml 30%-iger Trichloressigsäure (TCE) unterbrochen.

#### 2.2.3.1.2. Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase wird bei pH=9 in einem 0.2 m Glykokoll-Natronlauge-Puffer gemessen. Bei Bedarf werden 5 Teile Puffer und 1 Teil einer 2,5%-igen wässrigen Lösung von  $\text{Na}_2\beta$ -Glycerophosphat gemischt.

Ansatz: 5 ml Puffer - Substratlösung  
1 ml Enzymlösung

Nach 20 bzw. 45 Minuten Incubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 2 ml 15%-iger TCE unterbrochen.

Die Substrat-Puffer-Gemische wurden ebenso wie die Enzymlösungen 10 Minuten vorincubiert. Dadurch wird eine Angleichung an die Temperatur des Wasserbades ermöglicht, und damit eine Vorbedingung für den Ablauf einer linearen Reaktion erfüllt. Bei jedem Ansatz lief ein Nullwert mit, der den Phosphatgehalt vor Beginn der Reaktion bestimmt. Dieser muß bei Berechnung der spezifischen Aktivität berücksichtigt werden.

Bei Zusatz von TCE fällt in allen Proben das Eiweiß aus. Nach dem Zentrifugieren wird in dem Überstand das anorganische Phosphat nach der Methode von LOHMANN und JENDRASIK (48) bestimmt:

Meßansatz: 5 ml 2,5%-ige Lösung von  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  in 5 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
2 ml Überstand  
1 ml Amidolreagenz (nach Vorschrift)  
ad 25 ml Wasser

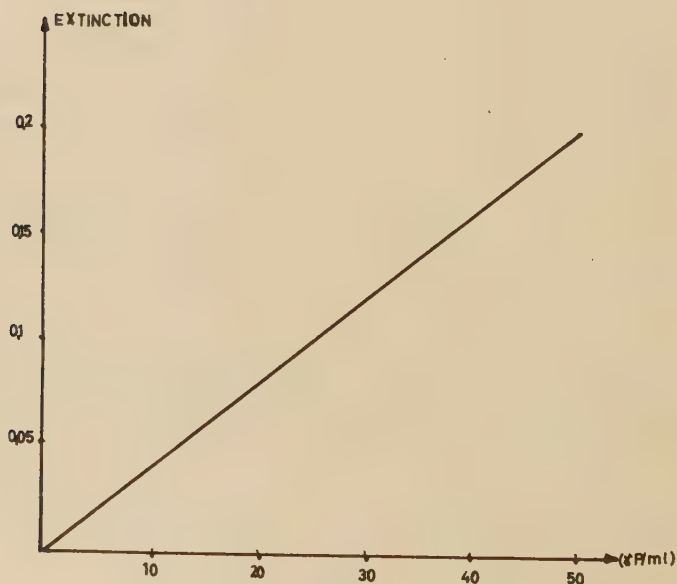
Dieser Ansatz wird 7 Minuten bei 37°C und weitere 7 Minuten bei 20°C incubiert.

Die durch das entstandene Molybdänblau bedingte Farbe ist etwa 30 Minuten constant. Die Farbintensität wurde im ELKO II (Zeiss) photometrisch bei Filter J 61,7 gemessen. Die Differenz zwischen dem Nullwert und dem incubierten

Ansatz entspricht dem bei der Reaktion gebildeten Phosphat.

Aus der Eichkurve wird der Wert in  $\mu$  Phosphor (P) entnommen, der zu der gemessenen Extinktion gehört. Die Eichkurve wird ermittelt, indem bekannte Phosphormengen in Form des primären Kaliumphosphats in verschiedene Meßansätze eingebracht werden.

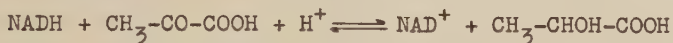
Abb. 1: Eichkurve zur Bestimmung des Phosphatgehaltes in den Meßansätzen.



Die Aktivität der Phosphatasen wird angegeben in  $\mu$  Phosphor, die pro mg Homogenatstickstoff freigesetzt werden. Die Stickstoffbestimmung erfolgte nach dem MIKRO-KJEL-DAHL-Verfahren (14).

### 2.2.3.2. Die Lactatdehydrogenase (LDH)

Die Enzymaktivität der LDH wird nach dem für NAD-abhängige Dehydrogenasen allgemeinen Prinzip, dem optischen Test nach WARBURG bestimmt. Man verfolgt bei 340 oder 366 m $\mu$  die Ab- oder Zunahme der Absorption. Die Reaktionsgleichung lautet:



Für die in unseren Versuchen gemessene Hinreaktion verwendeten wir die Testzusammensetzung der Fa. BÖHRINGER:

- 0.05 m        Phosphatpuffer, pH=7.5
- 8.10<sup>-3</sup> m     NADH + H<sup>+</sup> in 1%-iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung
- 3.1.10<sup>-4</sup> m   Pyruvat

#### Bestimmungsansatz:

Die Substrat-Puffer-Lösung und die in geeigneter Verdünnung vorliegende Enzymlösung werden vor Gebrauch auf 25°C gebracht. Nacheinander werden in eine 10 mm Cuvette pipettiert:

- 2.85 ml Phosphat-Pyruvat-Lösung
- 0.05 ml NADH + H<sup>+</sup>; durch Zugabe von
- 0.10 ml Enzymlösung wird die Reaktion gestartet.

Die Extinctionsänderung wird 5 Minuten lang jede Minute am Photometer (z.B. EPPENDORF) abgelesen. Der Extinctionszuwachs pro Minute ergibt sich als der Mittelwert der 5 Einzelmessungen.

#### Berechnung der Enzymaktivität:

Die Enzymaktivität wird normalerweise auf 1 ml Untersuchungsmaterial bezogen. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde zusätzlich der Stickstoffgehalt der Enzymlösungen bestimmt (14).

1 Standardeinheit (U) ist diejenige Enzymmenge, die bei 25°C in 1 Minute 1  $\mu$ Mol Substrat umsetzt.

$$U = \frac{\text{Extinctionszuwachs}}{\text{Minute}} \cdot \frac{\text{Testvolumen} \cdot F}{\text{Extinctionskoeffizient} \cdot \text{Schichtdicke}}$$

Für unsere Versuche gilt:

|                                                                         |                                            |
|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Testvolumen                                                             | 3 cm <sup>3</sup>                          |
| Molarer Extinktionskoeffizient<br>von NADH bei 366 m $\mu$              | 3.3 · 10 <sup>6</sup> cm <sup>2</sup> /Mol |
| Schichtdicke der Cuvette                                                | 10 mm                                      |
| F berücksichtigt, daß statt 1 ml<br>0.1 ml Enzymlösung eingesetzt wurde | 10                                         |

Die Enzymaktivität errechnet sich in dem angewendeten Meßverfahren folglich als Extinctionszuwachs/Minute · 9.1 ( $\mu$ Mol NADH/min/ml). Bei der Darstellung der Ergebnisse haben wir die Aktivität der Lactatdehydrogenase in Milli-einheiten bezogen auf den Gewebestickstoff angegeben: m $\mu$ Mol NADH/min/mg N. Sie werden aus dem Extinctionszuwachs/min durch Multiplikation mit dem Faktor 9100 unter Berücksichtigung des Stickstoffgehaltes pro ml Homogenat ermittelt.

#### 2.2.4. Statistische Auswertung

Zum Vergleich des "normalen" Enzymspiegels mit den Enzymaktivitäten nach Trasylolinjektion wurde der sogenannte "t-Test" (siehe auch Fußnote!) herangezogen. Der t-Test wird benutzt, um zu beurteilen, ob Mittelwerte  $\bar{x}_1$  und  $\bar{x}_2$  zweier getrennter Meßreihen sich unterscheiden oder nicht. Da jeweils nur 2 - 3 Einzelmessungen der 1/2, 1, 2, 3 und 5 Stundenwerte vorliegen, wurden die Gesamtreihen miteinander verglichen.

Wir halten dies für gerechtfertigt, da in den ersten 5 Stunden nach Injektion des Trasylols (R) ein meßbarer Inaktivatorspiegel in Blut und Organen des Versuchstieres nachgewiesen werden kann. Es darf aber nicht übersehen werden, daß die statistischen Ergebnisse wegen des Vergleiches der Gesamtreihen nur eine grobe Orientierung vermitteln.

Aus den Einzelmessungen ( $x_i$ ) wird zunächst der

$$\text{Mittelwert } \bar{x} = \frac{x_i}{n} \text{ der Meßreihen bestimmt.}$$

Zur Beurteilung der Genauigkeit dieser Messungen ermittelt man den

mittleren Fehler der Einzelmessungen

$$sx_i = \pm \sqrt{\frac{(\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}}$$

und den mittleren Fehler des Mittelwertes

$$s\bar{x} = \pm \frac{sx_i}{\sqrt{n}}$$

Die Genauigkeit des Mittelwertes wächst, bzw. die Streuung vermindert sich also mit der Wurzel aus der Anzahl der Messungen, 2/3 der Einzelabweichungen ( $\bar{x} - x_i$ ) sind kleiner als der mittlere Fehler  $sx_i$  der Einzelbeobachtungen.

In den eigentlichen "t-Test" gehen die genannten Größen ein:

$$t = \frac{D}{S_D}$$

In dieser Formel stellt

$$D = \bar{x}_1 - \bar{x}_2$$

die Differenz der Mittelwerte dar, während  $s_D$  die mittleren Fehler der Mittelwerte zueinander in Beziehung setzt:

$$s_D = \sqrt{(s\bar{x}_1)^2 + (s\bar{x}_2)^2}$$

t gehört zu einem System von  $m = (n - 1)$  Freiheitsgraden. Aus einer Tabelle <sup>(+)</sup> wird das für t und m zugehörige p ermittelt, das ein Kriterium für Übereinstimmung der in den beiden Meßreihen gemessenen Größen ist.

Es gilt:

- $p > 0.05$  kein Grund, die Differenz nicht als zufällig anzusehen
- $p < 0.05$  Zweifel an der Übereinstimmung begründet
- $p < 0.01$  Die Differenz ist schwach gesichert
- $p < 0.001$  Die Differenz ist gut gesichert

Streng genommen ist der t-Test nur bei zwei gleich großen Meßreihen erlaubt. Wir haben ihn bei der Auswertung unserer Versuche trotzdem benutzt, da die Tabelle über die Verteilung von t für alle in Frage kommenden Freiheitsgrade dasselbe Ergebnis liefert.

---

(<sup>+</sup>) K. Patau, Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (eine neue t-Tabelle), Biol. Zbl., 63 (1943),

## 2.3. Eigene Ergebnisse

### 2.3.1. Vorbemerkungen

In einigen Vorversuchen wurden die optimalen Verdünnungen der aus dem Homogenat gewonnenen Enzymlösungen festgelegt.

- 1.) Tab. 2: Optimale Verdünnungen der Enzymlösungen aus dem 20%-igen Homogenat zur Aktivitätsmessung der untersuchten Fermente.

|       | ALKALISCHE<br>PHOSPHATASE | SAURE<br>PHOSPHATASE | LACTAT<br>DEHYDROGENASE |
|-------|---------------------------|----------------------|-------------------------|
| LEBER | 1 : 1                     | 1 : 5                | 1 : 100                 |
| LUNGE | 1 : 1                     | 1 : 1                | 1 : 50                  |
| NIERE | 1 : 5                     | 1 : 5                | 1 : 200                 |

- 2.) Bei der Wahl dieser Homogenatverdünnungen ergab sich bei einer Incubationszeit von 20 bzw. 45 Minuten ein annähernd linearer Reaktionsablauf für die Phosphat-  
abspaltung. Die sekundären Hemmeffekte auf die Fer-  
mente sind umso geringer, je kürzer die Incubations-  
zeit gewählt wird. Zur Ermittlung der spezifischen  
Aktivität der Phosphatasen wurden deswegen nur die  
Werte der 20-minütigen Incubationszeit herangezogen.

Die bei der Messung der LDH-Aktivität eingesetzten Verdünnungen ergaben einen Extinctionszuwachs von weniger als 0.020 Einheiten pro Minute. Innerhalb dieser Grenze läuft bei vorgegebener Substratkonzentration eine Reaktion nullter Ordnung ab. Die Ablesegenauigkeit am verwendeten Photometer EPPENDORF ist in diesem Bereich ausreichend.

Die angegebenen Aktivitäten der Enzymlösungen stellen im allgemeinen den Mittelwert aus 3 parallelen Ansätzen dar.

Die Lactatdehydrogenase wurde in der frisch zubereiteten Enzymlösung, die Phosphatasen einen Tag später gemessen. Sie wurden zwischenteitlich eingefroren. Diese Manipulation bedingt keine wesentliche Aktivitätsänderung (JUNG und HELD, 37A). Durch die Unterkühlung sollte gleichzeitig der fermentative Abbau des Trasylols (R) vermieden werden.

Im folgenden Abschnitt werden die Versuchsergebnisse und ihre Auswertung auszugsweise wiedergegeben.

2.3.2. Auszüge aus den Versuchsprotokollen und ihre Auswertung

2.3.2.1. Ergebnisse der unspezifischen alkalischen Phosphatase

2.3.2.1.1. Bestimmung der "normalen" Enzymaktivität in der Niere

Die Enzymaktivitäten wurden bei 8 Versuchstieren gemessen. Die aus den Organhomogenaten gewonnenen Enzymlösungen wurden im Verhältnis 1:5 mit 0.9%-iger NaCl-Lösung verdünnt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tab. 3: Bestimmung der "normalen" Aktivität der alkalischen Phosphatase in der Meerschweincheniere.

| Versuch No. | Incubationszeit | Extinction $\Delta e$ | mg Stickstoff/ml Homogenat | $\bar{x}$ P/mg N/h |
|-------------|-----------------|-----------------------|----------------------------|--------------------|
| 1           | 20'<br>45'      | 0.013<br>0.029        | 0.90                       | 213<br>211         |
| 2           | 20'<br>45'      | 0.014<br>0.030        | 1.40                       | 146<br>141         |
| 3           | 20'<br>45'      | 0.024<br>0.043        | 1.60                       | 218<br>179         |
| 4           | 20'<br>45'      | 0.018<br>0.035        | 1.60                       | 169<br>143         |
| 5           | 20'<br>45'      | 0.013<br>0.027        | 1.23                       | 156<br>132         |
| 6           | 20'<br>45'      | 0.018<br>0.045        | 1.95                       | 139<br>153         |
| 7           | 20'<br>45'      | 0.019<br>0.042        | 2.00                       | 138<br>138         |
| 8           | 20'<br>45'      | 0.010<br>0.024        | 1.29                       | 112<br>120         |

Aus den acht Einzelmessungen errechnet sich ein Mittelwert

$$\bar{x}_1 = 161 \text{ } \bar{x} \text{ P/mg N/h}$$

Zur Beurteilung der Genauigkeit der Messungen geben wir den mittleren Fehler der Einzelmessungen ( $s_{x_1}$ ) und den mittleren Fehler des Mittelwertes ( $s_{\bar{x}_1}$ ) an:

$$s_{x_1} = \pm 37 \text{ } \bar{x} \text{ P/mg N/h}$$

$$s_{\bar{x}_1} = \pm 14 \text{ } \bar{x} \text{ P/mg N/h}$$

### 2.3.2.1.2. Bestimmung der Aktivität der alkalischen Nierenphosphatase nach Injektion von Trasylol (R)

Insgesamt wurden 12 Versuchstiere zur Bestimmung der Enzymaktivität nach Trasylolinjektion herangezogen. Die Organe wurden jeweils 1/2, 1, 2, 3 oder 5 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 50.000 KIE exstirpiert. Tab. 4 vermittelt einen Überblick über die Ergebnisse.

Tab. 4: Aktivität der alkalischen Nierenphosphatase nach i.p. Injektion von 50.000 KIE in Abhängigkeit von der Zeit.

| Intravitale Wirkzeit d. TRASYLOL | Incubationszeit | Extinction $\Delta e$ | mg Stickstoff/ml Homogenat | $\delta P/mg N/h$ |
|----------------------------------|-----------------|-----------------------|----------------------------|-------------------|
| 0.5 h                            | 20'             | 0.021                 | 1.85                       | 169               |
|                                  | 45'             | 0.048                 |                            | 171               |
| 0.5 h                            | 20'             | 0.037                 | 2.35                       | 232               |
|                                  | 45'             | 0.079                 |                            | 217               |
| 0.5 h                            | 20'             | 0.019                 | 2.04                       | 136               |
|                                  | 45'             | 0.040                 |                            | 130               |
| 1 h                              | 20'             | 0.012                 | 1.18                       | 147               |
|                                  | 45'             | 0.027                 |                            | 149               |
| 1 h                              | 20'             | 0.019                 | 1.76                       | 157               |
|                                  | 45'             | 0.040                 |                            | 151               |
| 1 h                              | 20'             | 0.016                 | 2.04                       | 118               |
|                                  | 45'             | 0.034                 |                            | 110               |
| 2 h                              | 20'             | 0.012                 | 1.12                       | 155               |
|                                  | 45'             | 0.027                 |                            | 157               |
| 2 h                              | 20'             | 0.017                 | 1.68                       | 150               |
|                                  | 45'             | 0.036                 |                            | 141               |
| 3 h                              | 20'             | 0.020                 | 2.10                       | 140               |
|                                  | 45'             | 0.046                 |                            | 145               |
| 3 h                              | 20'             | 0.024                 | 2.10                       | 165               |
|                                  | 45'             | 0.053                 |                            | 166               |
| 5 h                              | 20'             | 0.019                 | 2.02                       | 137               |
|                                  | 45'             | 0.042                 |                            | 137               |
| 5 h                              | 20'             | 0.015                 | 1.62                       | 137               |
|                                  | 45'             | 0.034                 |                            | 138               |

Wegen der geringen Versuchszahl für die einzelnen Zeitstufen nach Trasylolinjektion haben wir aus allen 12 Einzelmessungen einen gemeinsamen Mittelwert ( $\bar{x}_2$ ) errechnet (vgl. den Absatz "Statistische Auswertung"):

$$\bar{x}_2 = 154 \delta P/mg N/h$$

Zur Beurteilung der Genauigkeit der Messungen geben wir wiederum den mittleren Fehler der Einzelmessungen ( $sx_1$ ) und den mittleren Fehler des Mittelwertes ( $s\bar{x}_2$ ) an:

$$sx_1 = \pm 28 \delta P/mg N/h$$

$$s\bar{x}_2 = \pm 8 \delta P/mg N/h$$

### 2.3.2.1.3. Vergleich der "normalen" Aktivität der alkalischen Nierenphosphatase mit der Trasylolmeßreihe

Bei Anwendung des "t-Testes" ergibt sich wegen

$$D = \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 7 \text{ IP/mg N/h (Differenz der Mittelwerte) u.}$$

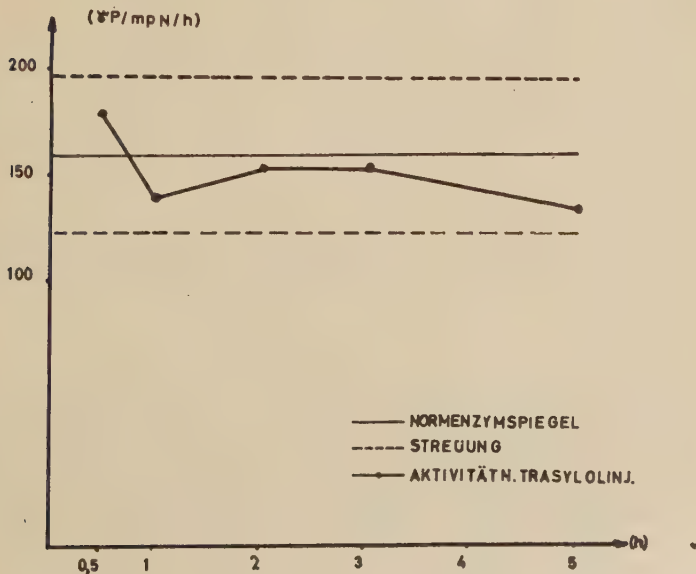
$$s_D = \sqrt{(s\bar{x}_1)^2 + (s\bar{x}_2)^2} = 16 \text{ IP/mg N/h}$$

$$t = \frac{D}{s_D} = 0.43$$

Nach der Tabelle über die t-Verteilung entspricht dieser Wert einem  $p > 0.05$ . Das bedeutet, es besteht kein Grund, die Differenz zwischen den beiden Meßreihen nicht als zufällig anzusehen.

Abbildung 2 gibt die Ergebnisse der alkalischen Nierenphosphatase graphisch wieder.

Abb. 2: "Normale" Aktivität der alkalischen Nierenphosphatase und ihre Streuung. Die Aktivitäten nach Trasylolinjektion sind in Abhängigkeit von der intravitalen Wirkzeit aufgetragen.



### 2.3.2.1.4. Bestimmung der "normalen" Enzymaktivität in der Leber

Die Enzymaktivitäten wurden bei 9 Versuchstieren gemessen. Die aus den Organhomogenaten gewonnenen Enzymlösungen wurden unverdünnt in die Reaktion eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 4: "Normale" Aktivitäten der alkalischen Leberphosphatase des Meerschweinchens.

| Versuch No. | Incubationszeit | Extinction $\Delta e$ | mg N/ml Homogenat | $\bar{x}$ P/mg N/h |
|-------------|-----------------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| 1           | 20'             | 0.010                 | 1.70              | 17                 |
|             | 45'             | 0.013                 |                   | 10                 |
| 2           | 20'             | 0.012                 | 2.36              | 15                 |
|             | 45'             | 0.013                 |                   | 7                  |
| 3           | 20'             | 0.010                 | 1.70              | 17                 |
|             | 45'             | 0.022                 |                   | 17                 |
| 4           | 20'             | 0.012                 | 1.84              | 19                 |
|             | 45'             | 0.018                 |                   | 13                 |
| 5           | 20'             | 0.010                 | 2.34              | 12                 |
|             | 45'             | 0.017                 |                   | 10                 |
| 6           | 20'             | 0.009                 | 2.20              | 12                 |
|             | 45'             | 0.014                 |                   | 8                  |
| 7           | 20'             | 0.011                 | 2.40              | 13                 |
|             | 45'             | 0.013                 |                   | 7                  |
| 8           | 20'             | 0.009                 | 2.50              | 10                 |
|             | 45'             | 0.016                 |                   | 9                  |
| 9           | 20'             | 0.008                 | 2.30              | 10                 |
|             | 45'             | 0.020                 |                   | 11                 |

Aus den 9 Einzelmessungen errechnet sich der Mittelwert der Aktivität der alkalischen Leberphosphatase:

$$\bar{x}_1 = 14 \text{ } \bar{x}\text{P/mg N/h } (^+)$$

Zur Beurteilung der Genauigkeit der Messungen wird der mittlere Fehler der Einzelmessungen ( $sx_1$ ) und der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben ( $s\bar{x}_1$ ):

$$sx_1 = 3 \text{ } \bar{x}\text{P/mg N/h}$$

$$s\bar{x}_1 = \pm 1 \text{ } \bar{x}\text{P/mg N/h}$$

---

(<sup>+</sup>) Die Ergebnisse bei den verschiedenen Incubationszeiten differieren zum Teil erheblich. Auch die 3 Parallelansätze ergaben nicht immer übereinstimmende Werte. Eine stärkere Verdünnung der Enzymlösung konnte nicht gewählt werden, da die Extinctionen schon bei der vorliegenden Versuchsanordnung sehr niedrig liegen. Dies dürfte zum Teil die starken Differenzen erklären.

### 2.3.2.1.5. Aktivitätsbestimmung der alkalischen Leberphosphatase nach Injektion von Trasylol (R)

Die injizierte Dosis betrug einheitlich bei allen 12 Versuchstieren etwa 100.000 KIE/kg. Tabelle 5 gibt die gemessenen Aktivitätswerte zusammenhängend wieder.

Tab. 5: Aktivitäten der alkalischen Leberphosphatase nach intraperitonealer Injektion von 50.000 KIE in Abhängigkeit von der intravitalen Wirkzeit.

| Intravitale Wirkzeit d. TRASYLOL | Incubationszeit | Extinction $\Delta e$ | mg N/ml Homogenat | $\bar{x}$ P/mg N/h |
|----------------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| 0.5 h                            | 20'             | 0.007                 | 2.20              | 9                  |
|                                  | 45'             | 0.016                 |                   | 10                 |
| 0.5 h                            | 20'             | 0.008                 | 1.89              | 13                 |
|                                  | 45'             | 0.016                 |                   | 11                 |
| 0.5 h                            | 20'             | 0.015                 | 2.15              | 21                 |
|                                  | 45'             | 0.028                 |                   | 17                 |
| 1 h                              | 20'             | 0.005                 | 3.22              | 5                  |
|                                  | 45'             | 0.010                 |                   | 4                  |
| 1 h                              | 20'             | 0.006                 | 2.44              | 7                  |
|                                  | 45'             | 0.017                 |                   | 9                  |
| 1 h                              | 20'             | 0.013                 | 2.40              | 16                 |
|                                  | 45'             | 0.025                 |                   | 14                 |
| 2 h                              | 20'             | 0.005                 | 2.10              | 7                  |
|                                  | 45'             | 0.012                 |                   | 7                  |
| 2 h                              | 20'             | 0.003                 | 2.04              | 4                  |
|                                  | 45'             | 0.007                 |                   | 5                  |
| 3 h                              | 20'             | 0.016                 | 2.70              | 18                 |
|                                  | 45'             | 0.023                 |                   | 11                 |
| 3 h                              | 20'             | 0.004                 | 2.36              | 5                  |
|                                  | 45'             | 0.017                 |                   | 10                 |
| 5 h                              | 20'             | 0.007                 | 2.14              | 10                 |
|                                  | 45'             | 0.023                 |                   | 14                 |
| 5 h                              | 20'             | 0.010                 | 1.35              | 21                 |
|                                  | 45'             | 0.016                 |                   | 16                 |

Aus den Einzelmessungen wurde der Mittelwert errechnet (siehe Fußnote S. 24 !):

$$\bar{x}_2 = 11 \bar{x} \text{ P/mg N/h}$$

Zur Beurteilung der Genauigkeit der Messungen geben wir wiederum den mittleren Fehler der Einzelmessungen ( $s\bar{x}_1$ ) und den mittleren Fehler des Mittelwertes an ( $s\bar{x}_2$ ):

$$s\bar{x}_1 = \pm 6 \bar{x} \text{ P/mg N/h}$$

$$s\bar{x}_2 = \pm 2 \bar{x} \text{ P/mg N/h}$$

### 2.3.2.1.6. Vergleich der "normalen" Aktivität der alkalischen Leberphosphatase mit der Trasylolmeßreihe

Bei Anwendung des "t-Testes" ergibt sich wegen

$$D = \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 3 \text{ } \gamma\text{P/mg N/h (Differenz der Mittelwerte) u.}$$

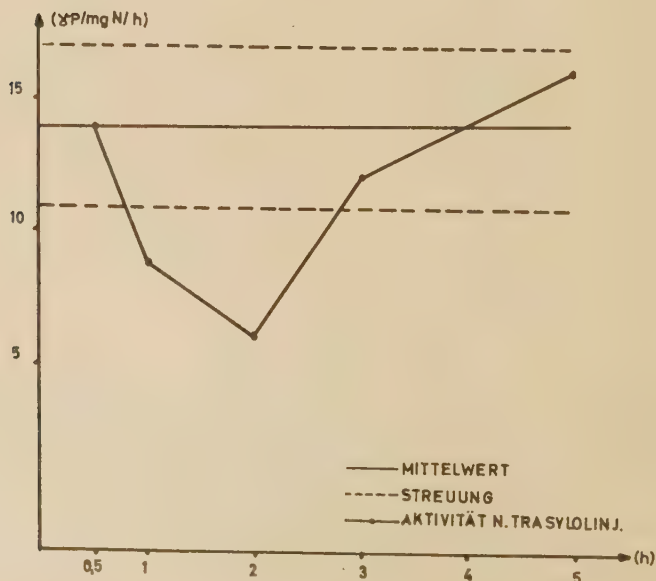
$$s_D = \sqrt{(s\bar{x}_1)^2 + (s\bar{x}_2)^2} = 2 \text{ } \gamma\text{P/mg N/h}$$

$$t = \frac{D}{s_D} = 1.5$$

Nach der Tabelle über die t-Verteilung entspricht dieser Wert einem  $p > 0.05$ . Das bedeutet, es besteht kein Grund, die Differenz zwischen den beiden Meßreihen nicht als zufällig anzusehen.

Abbildung 3 gibt die Ergebnisse der alkalischen Leberphosphatase graphisch wieder.

Abb. 3: "Normale" Aktivität der alkalischen Leberphosphatase und ihre Streuung. Die Aktivitäten nach Trasylolinjektion sind in Abhängigkeit von der intravitalen Wirkzeit aufgetragen.



### 2.3.2.1.7. Bestimmung der "normalen" Aktivität der alkalischen Lungenphosphatase

Die Enzymaktivitäten wurden bei 9 Versuchstieren bestimmt. Die aus den Organhomogenaten gewonnene Enzymlösung wurde unverdünnt in den Bestimmungsansatz eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tab. 7: "Normale" Aktivitäten der alkalischen Lungenphosphatase des Meerschweinchens

| Versuch No. | Incubationszeit | Extinction $\Delta e$ | mg N/ml Homogenat | $\bar{x}$ P/mg N/h |
|-------------|-----------------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| 1           | 20'<br>45'      | 0.021<br>0.045        | 0.56              | 111<br>107         |
| 2           | 20'<br>45'      | 0.018<br>0.038        | 0.53              | 100<br>117         |
| 3           | 20'<br>45'      | 0.021<br>0.046        | 0.56              | 111<br>109         |
| 4           | 20'<br>45'      | 0.022<br>0.043        | 0.60              | 108<br>95          |
| 5           | 20'<br>45'      | 0.031<br>0.071        | 0.73              | 124<br>129         |
| 6           | 20'<br>45'      | 0.013<br>0.033        | 0.38              | 101<br>115         |
| 7           | 20'<br>45'      | 0.013<br>0.028        | 0.48              | 80<br>77           |
| 8           | 20'<br>45'      | 0.013<br>0.030        | 0.49              | 78<br>81           |
| 9           | 20'<br>45'      | 0.016<br>0.029        | 0.50              | 96<br>76           |

Aus den Einzelmessungen errechnet sich die mittlere Aktivität der alkalischen Lungenphosphatase zu

$$\bar{x}_1 = 101 \text{ } \bar{x} \text{ P/mg N/h}$$

Der mittlere Fehler der Einzelmessungen ( $sx_1$ ) und der mittlere Fehler des Mittelwertes ( $s\bar{x}_1$ ) betragen:

$$sx_1 = \pm 15 \text{ } \bar{x} \text{ P/mg N/h}$$

$$s\bar{x}_1 = \pm 5 \text{ } \bar{x} \text{ P/mg N/h}$$

2.3.2.1.8. Aktivitätsbestimmung der alkalischen Lungenphosphatase nach Injektion von Trasylol (R)

Die intraperitoneal injizierte Dosis betrug einheitlich bei allen 12 Versuchstieren etwa 100.000 KIE/kg. Tabelle 8 gibt eine Zusammenfassung der Ergebnisse wieder.

Tab. 8: Aktivitäten der alkalischen Lungenphosphatase nach Injektion von 50.000 KIE in Abhängigkeit von der intravitalen Wirkzeit.

| Intravitale Wirkzeit d. TRASYLOL | Incubationszeit | Extinction $\Delta e$ | mg N/ml Homogenat | γP/mg N/h |
|----------------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|-----------|
| 0.5 h                            | 20'             | 0.036                 | 0.90              | 120       |
|                                  | 45'             | 0.089                 |                   | 130       |
| 0.5 h                            | 20'             | 0.026                 | 0.68              | 113       |
|                                  | 45'             | 0.062                 |                   | 119       |
| 0.5 h                            | 20'             | 0.015                 | 0.42              | 106       |
|                                  | 45'             | 0.034                 |                   | 107       |
| 1 h                              | 20'             | 0.018                 | 0.67              | 81        |
|                                  | 45'             | 0.042                 |                   | 82        |
| 1 h                              | 20'             | 0.019                 | 0.74              | 75        |
|                                  | 45'             | 0.044                 |                   | 78        |
| 1 h                              | 20'             | 0.011                 | 0.48              | 68        |
|                                  | 45'             | 0.025                 |                   | 69        |
| 2 h                              | 20'             | 0.023                 | 0.72              | 95        |
|                                  | 45'             | 0.054                 |                   | 99        |
| 2 h                              | 20'             | 0.011                 | 0.39              | 83        |
|                                  | 45'             | 0.024                 |                   | 81        |
| 3 h                              | 20'             | 0.040                 | 1.01              | 117       |
|                                  | 45'             | 0.093                 |                   | 121       |
| 3 h                              | 20'             | 0.043                 | 0.87              | 148       |
|                                  | 45'             | 0.095                 |                   | 144       |
| 5 h                              | 20'             | 0.019                 | 0.49              | 113       |
|                                  | 45'             | 0.043                 |                   | 116       |
| 5 h                              | 20'             | 0.023                 | 0.48              | 142       |
|                                  | 45'             | 0.053                 |                   | 146       |

Aus den 12 Einzelmessungen wurde der Mittelwert ( $\bar{x}_2$ ) errechnet:

$$\bar{x}_2 = 105 \text{ γP/mg N/h}$$

Der mittlere Fehler der Einzelmessungen betrug:

$$sx_1 = \pm 25 \text{ γP/mg N/h}$$

Der mittlere Fehler des Mittelwertes wurde zu

$$s\bar{x}_2 = \pm 7 \text{ γP/mg N/h bestimmt.}$$

### 2.3.2.1.9. Vergleich der "normalen" Aktivität der alkalischen Phosphatase aus der Meerschweinchenlunge mit der Trasylolmeßreihe

Bei Anwendung des "t-Testes" ergibt sich wegen

$$D = \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 4 \text{ } \uparrow \text{P/mg N/h (Differenz der Mittelwerte)u.}$$

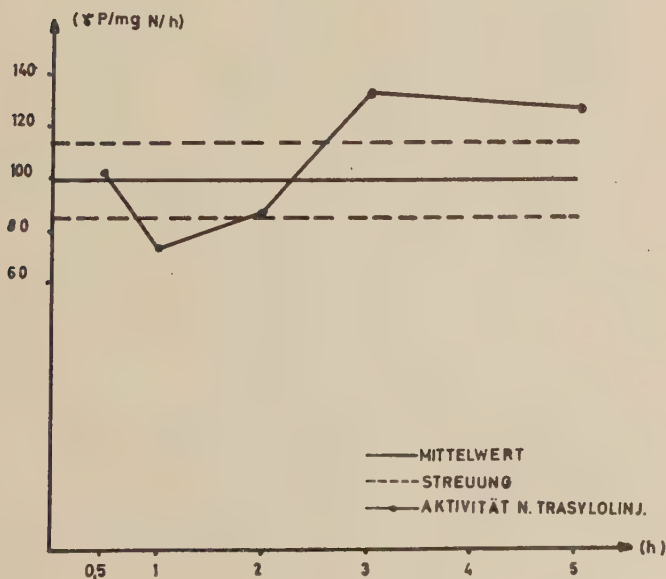
$$s_D = \sqrt{(s\bar{x}_1)^2 + (s\bar{x}_2)^2} = 9 \text{ } \uparrow \text{P/mg N/h}$$

$$t = \frac{D}{s_D} = 0.45$$

Nach der Tabelle über die t-Verteilung entspricht dieser Wert einem  $p > 0.05$ . Das bedeutet, es besteht kein Grund, die Differenz der beiden Meßreihen nicht als zufällig anzusehen.

Abbildung 4 gibt die Ergebnisse der alkalischen Lungenphosphatase graphisch wieder.

Abb. 4: "Normale" Aktivität der alkalischen Lungenphosphatase und ihre Streuung. Die Aktivitäten nach Trasylolinjektion sind in Abhängigkeit von der intravitalen Wirkzeit angegeben.



2.3.2.2. Ergebnisse der unspezifischen sauren Phosphatase

2.3.2.2.1. Bestimmung der "normalen" Aktivität der sauren Nierenphosphatase

Die Enzymaktivitäten wurden bei 9 Versuchstieren bestimmt. Die aus den Organhomogenaten gewonnenen Enzymlösungen wurden im Verhältnis 1:5 mit 0.9%-iger Kochsalzlösung verdünnt, bevor sie in die Reaktion eingesetzt wurden. Tabelle 9 faßt die Ergebnisse zusammen.

Tab. 9: "Normale" Aktivität der sauren Nierenphosphatase des Meerschweinchens

| Versuch No. | Incubationszeit | Extinction $\Delta e$ | mg N/ml Homogenat | $\bar{x}$ P/mg N/h |
|-------------|-----------------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| 1           | 20'<br>45'      | 0.029<br>0.072        | 1.40              | 227<br>254         |
| 2           | 20'<br>45'      | 0.030<br>0.065        | 1.40              | 238<br>230         |
| 3           | 20'<br>45'      | 0.020<br>0.051        | 1.34              | 166<br>188         |
| 4           | 20'<br>45'      | 0.031<br>0.074        | 1.60              | 217<br>228         |
| 5           | 20'<br>45'      | 0.026<br>0.054        | 1.23              | 239<br>219         |
| 6           | 20'<br>45'      | 0.025<br>0.058        | 1.85              | 151<br>156         |
| 7           | 20'<br>45'      | 0.026<br>0.063        | 1.95              | 151<br>160         |
| 8           | 20'<br>45'      | 0.032<br>0.069        | 2.00              | 177<br>170         |
| 9           | 20'<br>45'      | 0.020<br>0.044        | 1.29              | 172<br>170         |

Aus den 9 Einzelmessungen errechnet sich die mittlere Aktivität der sauren Nierenphosphatase zu

$$\bar{x}_1 = 193 \text{ } \bar{x} \text{ P/mg N/h}$$

Der mittlere Fehler der Einzelmessungen und der mittlere Fehler des Mittelwertes ( $s\bar{x}_1$ ) betragen:

$$s x_1 = \pm 37 \text{ } \bar{x} \text{ P/mg N/h}$$

$$s \bar{x}_1 = \pm 12 \text{ } \bar{x} \text{ P/mg N/h}$$

2.3.2.2.2. Aktivitätsbestimmung der sauren Nierenphosphatase nach Injektion von Trasylol (R)

Die intraperitoneal injizierte Dosis betrug einheitlich bei allen 12 Versuchstieren etwa 100.000 KIE/kg. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 10: Aktivitäten der sauren Nierenphosphatase nach Injektion von 50.000 KIE in Abhängigkeit von der intravitalen Wirkzeit.

| Intravitale Wirkzeit d. TRASYLOL | Incubationszeit | Extinction $\Delta e$ | mg/N/ml Homogenat | $\gamma$ P/mg N/h |
|----------------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| 0.5 h                            | 20'             | 0.039                 | 1.85              | 234               |
|                                  | 45'             | 0.083                 |                   | 222               |
| 0.5 h                            | 20'             | 0.037                 | 2.35              | 176               |
|                                  | 45'             | 0.088                 |                   | 185               |
| 0.5 h                            | 20'             | 0.033                 | 2.04              | 185               |
|                                  | 45'             | 0.074                 |                   | 181               |
| 1 h                              | 20'             | 0.030                 | 1.82              | 183               |
|                                  | 45'             | 0.064                 |                   | 173               |
| 1 h                              | 20'             | 0.037                 | 1.76              | 236               |
|                                  | 45'             | 0.076                 |                   | 214               |
| 1 h                              | 20'             | 0.035                 | 2.04              | 194               |
|                                  | 45'             | 0.076                 |                   | 184               |
| 2 h                              | 20'             | 0.032                 | 1.82              | 196               |
|                                  | 45'             | 0.075                 |                   | 204               |
| 2 h                              | 20'             | 0.032                 | 1.68              | 213               |
|                                  | 45'             | 0.072                 |                   | 212               |
| 3 h                              | 20'             | 0.037                 | 2.10              | 197               |
|                                  | 45'             | 0.082                 |                   | 193               |
| 3 h                              | 20'             | 0.039                 | 2.10              | 206               |
|                                  | 45'             | 0.090                 |                   | 212               |
| 5 h                              | 20'             | 0.039                 | 2.02              | 214               |
|                                  | 45'             | 0.089                 |                   | 219               |
| 5 h                              | 20'             | 0.031                 | 1.62              | 211               |
|                                  | 45'             | 0.068                 |                   | 209               |

Aus den 12 Einzelmessungen wurde der Mittelwert ( $\bar{x}_2$ ) bestimmt:

$$\bar{x}_2 = 204 \text{ } \gamma\text{P/mg N/h}$$

Der mittlere Fehler der Einzelmessungen ( $sx_1$ ) und der mittlere Fehler des Mittelwertes ( $s\bar{x}_2$ ) betragen:

$$sx_1 = \pm 20 \text{ } \gamma\text{P/mg N/h}$$

$$s\bar{x}_2 = \pm 6 \text{ } \gamma\text{P/mg N/h}$$

### 2.3.2.2.3. Vergleich der "normalen" Aktivität der sauren Nierenphosphatase mit der Trasylolmeßreihe

Bei Anwendung des "t-Testes" ergibt sich wegen

$$D = \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 11 \text{ } \mu\text{P/mg N/h (Differenz der Mittelwerte)}$$

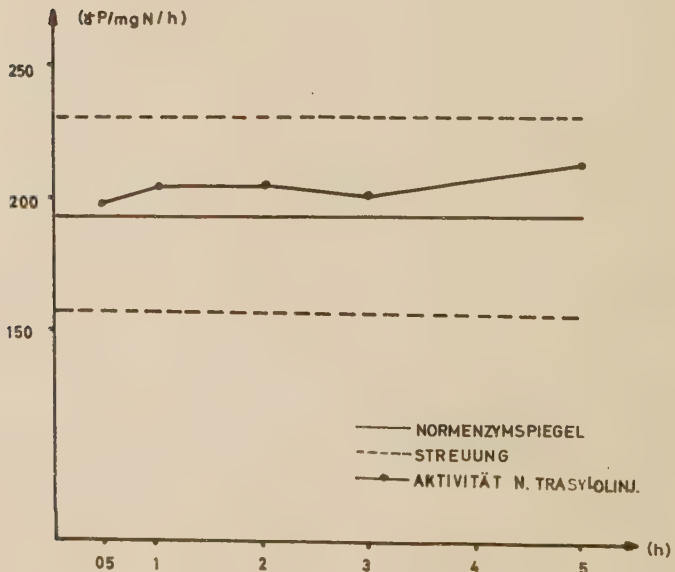
$$\text{u. } s_D = \sqrt{(s\bar{x}_1)^2 + (s\bar{x}_2)^2} = 14 \text{ } \mu\text{P/mg N/h}$$

$$t = \frac{D}{s_D} = 0.81$$

Nach der Tabelle über die t-Verteilung entspricht dieser Wert einem  $p > 0.05$ . Das bedeutet, es besteht kein Grund, die Differenz zwischen beiden Meßreihen nicht als zufällig anzusehen.

Abbildung 5 stellt die Ergebnisse von der sauren Nierenphosphatase graphisch dar.

Abb. 5: "Normale" Aktivität der sauren Nierenphosphatase und ihre Streuung. Die Aktivitäten nach Trasylol-injektion sind in Abhängigkeit von der intravitalen Wirkzeit aufgetragen.



#### 2.3.2.2.4. Bestimmung der "normalen" Aktivität der sauren Leberphosphatase

Die Enzymaktivitäten wurden bei 9 Versuchstieren bestimmt. Die aus den Organhomogenaten gewonnenen Enzymlösungen wurden im Verhältnis 1:5 mit 0.9%-iger NaCl-Lösung verdünnt, bevor sie in die Reaktion eingesetzt wurden. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 11: "Normale" Aktivität der sauren Leberphosphatase des Meerschweinchens

| Versuch No. | Incubationszeit | Extinction $\Delta e$ | mg N/ml Homogenat | $\gamma$ P/mg N/h |
|-------------|-----------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| 1           | 20'             | 0.009                 | 1.40              | 74                |
|             | 45'             | 0.023                 |                   | 82                |
| 2           | 20'             | 0.014                 | 1.70              | 90                |
|             | 45'             | 0.033                 |                   | 98                |
| 3           | 20'             | 0.026                 | 2.36              | 122               |
|             | 45'             | 0.053                 |                   | 112               |
| 4           | 20'             | 0.024                 | 1.82              | 148               |
|             | 45'             | 0.053                 |                   | 145               |
| 5           | 20'             | 0.019                 | 1.70              | 127               |
|             | 45'             | 0.043                 |                   | 127               |
| 6           | 20'             | 0.026                 | 2.40              | 120               |
|             | 45'             | 0.065                 |                   | 134               |
| 7           | 20'             | 0.031                 | 2.50              | 138               |
|             | 45'             | 0.075                 |                   | 128               |
| 8           | 20'             | 0.023                 | 2.30              | 112               |
|             | 45'             | 0.040                 |                   | 87                |
| 9           | 20'             | 0.021                 | 1.65              | 142               |
|             | 45'             | 0.043                 |                   | 131               |

Aus den Einzelmessungen errechnet sich die mittlere Aktivität der sauren Lungenphosphatase zu

$$\bar{x}_1 = 119 \text{ } \gamma \text{ P/mg N/h}$$

Der mittlere Fehler der Einzelmessungen und der mittlere Fehler des Mittelwertes ( $s\bar{x}_1$ ) betragen:

$$s x_1 = \pm 24 \text{ } \gamma \text{ P/mg N/h}$$

$$s \bar{x}_1 = \pm 8 \text{ } \gamma \text{ P/mg N/h}$$

2.3.2.2.5. Aktivitätsbestimmung der sauren Leberphosphatase nach Injektion von Trasylol (R)

Die intraperitoneal injizierte Dosis betrug einheitlich bei allen 12 Versuchstieren etwa 100.000 KIE/kg. In Tabelle 12 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 12: Aktivitäten der sauren Leberphosphatase nach Injektion von 50.000 KIE in Abhängigkeit von der intravitalen Wirkzeit.

| Intravitale Wirkzeit d. TRASYLOL | Incubationszeit | Extinction $\Delta e$ | mg N/ml Homogenat | $\Sigma P$ /mg N/h |
|----------------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| 0.5 h                            | 20'             | 0.014                 | 2.20              | 74                 |
|                                  | 45'             | 0.033                 |                   | 76                 |
| 0.5 h                            | 20'             | 0.012                 | 1.90              | 74                 |
|                                  | 45'             | 0.031                 |                   | 82                 |
| 0.5 h                            | 20'             | 0.015                 | 2.15              | 82                 |
|                                  | 45'             | 0.035                 |                   | 82                 |
| 1 h                              | 20'             | 0.022                 | 3.22              | 77                 |
|                                  | 45'             | 0.047                 |                   | 72                 |
| 1 h                              | 20'             | 0.016                 | 2.44              | 78                 |
|                                  | 45'             | 0.038                 |                   | 79                 |
| 1 h                              | 20'             | 0.026                 | 2.40              | 120                |
|                                  | 45'             | 0.057                 |                   | 117                |
| 2 h                              | 20'             | 0.026                 | 2.10              | 137                |
|                                  | 45'             | 0.052                 |                   | 122                |
| 2 h                              | 20'             | 0.024                 | 2.04              | 132                |
|                                  | 45'             | 0.055                 |                   | 132                |
| 3 h                              | 20'             | 0.022                 | 2.70              | 92                 |
|                                  | 45'             | 0.045                 |                   | 84                 |
| 3 h                              | 20'             | 0.022                 | 2.22              | 112                |
|                                  | 45'             | 0.050                 |                   | 112                |
| 5 h                              | 20'             | 0.022                 | 2.14              | 116                |
|                                  | 45'             | 0.052                 |                   | 119                |
| 5 h                              | 20'             | 0.019                 | 1.35              | 160                |
|                                  | 45'             | 0.043                 |                   | 160                |

Aus den 12 Einzelmessungen wurde der Mittelwert ( $\bar{x}_2$ ) bestimmt:

$$\bar{x}_2 = 105 \text{ } \Sigma P/\text{mg N/h}$$

Der mittlere Fehler der Einzelmessungen ( $sx_1$ ) und der mittlere Fehler des Mittelwertes ( $s\bar{x}_2$ ) betragen:

$$sx_1 = \pm 29 \text{ } \Sigma P/\text{mg N/h}$$

$$s\bar{x}_2 = \pm 8 \text{ } \Sigma P/\text{mg N/h}$$

### 2.3.2.2.6. Vergleich der "normalen" Aktivität der sauren Leberphosphatase mit der Trasylolmeßreihe

Bei Anwendung des "t-Testes" ergibt sich wegen

$$D = \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 14 \text{ } \delta\text{P/mg N/h (Differenz der Mittelwerte)u.}$$

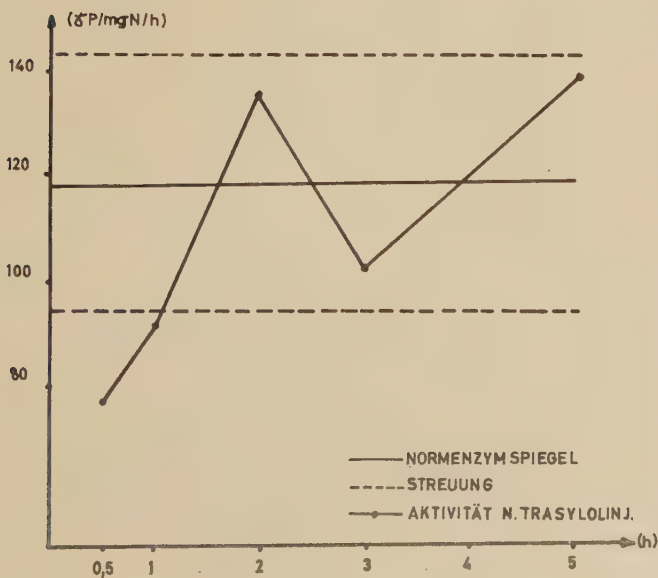
$$s_D = \pm \sqrt{(s\bar{x}_1)^2 + (s\bar{x}_2)^2} = 12 \text{ } \delta\text{P/mg N/h}$$

$$t = \frac{D}{s_D} = 1.2$$

Nach der Tabelle über die t-Verteilung entspricht dieser Wert einem  $p > 0.05$ . Das bedeutet, es besteht kein Grund, die Differenz zwischen beiden Meßreihen nicht als zufällig anzusehen.

Abbildung 6 stellt die Ergebnisse der sauren Leberphosphatase graphisch dar.

Abb. 6: "Normale" Aktivität der sauren Leberphosphatase und ihre Streuung. Die Aktivitäten nach Trasylolinjektion sind in Abhängigkeit von der intravitalen Wirkzeit aufgetragen.



### 2.3.2.2.7. Bestimmung der "normalen" Aktivität der sauren Lungenphosphatase

Die Enzymaktivitäten wurden bei 10 Versuchstieren bestimmt. Die aus den Organhomogenaten gewonnenen Enzymlösungen wurden unverdünnt in die Reaktion eingesetzt. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 13: "Normale" Aktivitäten der sauren Lungenphosphatase des Meerschweinchens.

| Versuch No. | Incubationszeit | Extinction $\Delta e$ | mg N/ml Homogenat | $\Sigma P$ /mg N/h |
|-------------|-----------------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| 1           | 20'             | 0.028                 | 0.56              | 112                |
|             | 45'             | 0.064                 |                   | 113                |
| 2           | 20'             | 0.024                 | 0.56              | 95                 |
|             | 45'             | 0.052                 |                   | 93                 |
| 3           | 20'             | 0.028                 | 0.53              | 119                |
|             | 45'             | 0.059                 |                   | 110                |
| 4           | 20'             | 0.024                 | 0.56              | 95                 |
|             | 45'             | 0.053                 |                   | 95                 |
| 5           | 20'             | 0.039                 | 0.73              | 121                |
|             | 45'             | 0.089                 |                   | 120                |
| 6           | 20'             | 0.020                 | 0.38              | 118                |
|             | 45'             | 0.041                 |                   | 108                |
| 7           | 20'             | 0.029                 | 0.48              | 135                |
|             | 45'             | 0.063                 |                   | 130                |
| 8           | 20'             | 0.019                 | 0.49              | 85                 |
|             | 45'             | 0.040                 |                   | 81                 |
| 9           | 20'             | 0.017                 | 0.50              | 76                 |
|             | 45'             | 0.044                 |                   | 87                 |
| 10          | 20'             | 0.024                 | 0.60              | 89                 |
|             | 45'             | 0.054                 |                   | 90                 |

Aus den 10 Einzelmessungen errechnet sich die mittlere Aktivität der sauren Lungenphosphatase zu

$$\bar{x}_1 = 105 \text{ } \Sigma P/\text{mg N/h}$$

Der mittlere Fehler der Einzelmessungen ( $sx_1$ ) und der mittlere Fehler des Mittelwertes ( $s\bar{x}_1$ ) betragen:

$$sx_1 = \begin{matrix} + \\ + \end{matrix} 19 \text{ } \Sigma P/\text{mg N/h}$$

$$s\bar{x}_1 = \begin{matrix} + \\ - \end{matrix} 6 \text{ } \Sigma P/\text{mg N/h}$$

### 2.3.2.2.8. Aktivitätsbestimmung der sauren Lungenphosphatase nach Injektion von Trasylol (R)

Die intraperitoneal injizierte Dosis betrug einheitlich bei allen 12 Versuchstieren etwa 100.000 KIE/kg. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 14: Aktivitäten der sauren Lungenphosphatase nach Injektion von 50.000 KIE in Abhängigkeit von der intravitalen Wirkzeit.

| Intravitale Wirkzeit d. TRASYLOL | Incubationszeit | Extinction $\Delta e$ | mg N/ml Homogenat | $\gamma$ P/mg N/h |
|----------------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| 0.5 h                            | 20'             | 0.043                 | 0.90              | 107               |
|                                  | 45'             | 0.097                 |                   | 107               |
| 0.5 h                            | 20'             | 0.024                 | 0.68              | 80                |
|                                  | 45'             | 0.054                 |                   | 80                |
| 0.5 h                            | 20'             | 0.018                 | 0.42              | 97                |
|                                  | 45'             | 0.043                 |                   | 102               |
| 1 h                              | 20'             | 0.023                 | 0.67              | 77                |
|                                  | 45'             | 0.056                 |                   | 83                |
| 1 h                              | 20'             | 0.038                 | 0.74              | 116               |
|                                  | 45'             | 0.088                 |                   | 118               |
| 1 h                              | 20'             | 0.020                 | 0.48              | 94                |
|                                  | 45'             | 0.049                 |                   | 100               |
| 2 h                              | 20'             | 0.028                 | 0.72              | 88                |
|                                  | 45'             | 0.074                 |                   | 101               |
| 2 h                              | 20'             | 0.017                 | 0.39              | 99                |
|                                  | 45'             | 0.040                 |                   | 101               |
| 3 h                              | 20'             | 0.056                 | 1.01              | 123               |
|                                  | 45'             | 0.121                 |                   | 118               |
| 3 h                              | 20'             | 0.056                 | 0.87              | 142               |
|                                  | 45'             | 0.126                 |                   | 144               |
| 5 h                              | 20'             | 0.023                 | 0.48              | 107               |
|                                  | 45'             | 0.050                 |                   | 104               |
| 5 h                              | 20'             | 0.030                 | 0.48              | 139               |
|                                  | 45'             | 0.067                 |                   | 137               |

Aus den 12 Einzelmessungen wurde der Mittelwert ( $\bar{x}_2$ ) bestimmt:

$$\bar{x}_2 = 106 \gamma\text{P/mg N/h}$$

Zur Beurteilung der Genauigkeit der Messungen geben wir wiederum den mittleren Fehler der Einzelmessungen ( $sx_1$ ) und den mittleren Fehler des Mittelwertes ( $s\bar{x}_2$ ) an:

$$sx_1 = \pm 21 \gamma\text{P/mg N/h}$$

$$s\bar{x}_2 = \pm 6 \gamma\text{P/mg N/h}$$

### 2.3.2.2.9. Vergleich der "normalen" Aktivität der sauren Lungenphosphatase mit der Trasylolmeßreihe

Bei Anwendung des "t-Testes" ergibt sich wegen

$$D = \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 1 \text{ P/mg N/h (Differenz der Mittelwerte)u.}$$

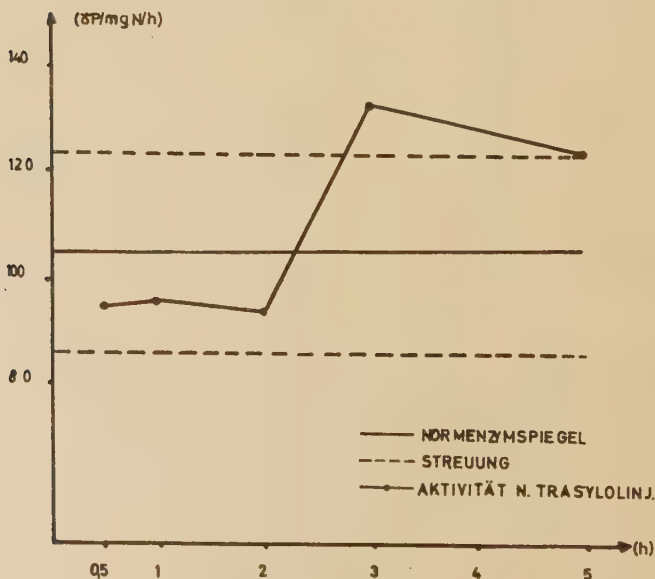
$$s_D = \sqrt{(s\bar{x}_1)^2 + (s\bar{x}_2)^2} = 9 \text{ P/mg N/h}$$

$$t = \frac{D}{s_D} = 0.12$$

Nach der Tabelle über die t-Verteilung entspricht dieser Wert einem  $p > 0.05$ . Das bedeutet, es besteht kein Grund, die Differenz zwischen beiden Meßreihen nicht als zufällig anzusehen.

Abbildung 7 stellt die Ergebnisse der sauren Lungenphosphatase graphisch dar.

Abb. 7: "Normale" Aktivität der sauren Lungenphosphatase und ihre Streuung. Die Aktivitäten nach Trasylolinjektion sind in Abhängigkeit von der intravitalen Wirkzeit aufgetragen.



2.3.2.3. Ergebnisse der Lactatdehydrogenase

2.3.2.3.1. Bestimmung der "normalen" Aktivität der Nieren-Lactatdehydrogenase

Die Enzymaktivitäten wurden bei 9 Versuchstieren gemessen. Die aus den Organhomogenaten gewonnenen Enzymlösungen wurden im Verhältnis 1:200 mit 0.9%-iger NaCl-Lösung verdünnt, bevor sie in die Reaktion eingesetzt wurden. In Tabelle 15 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 15: "Normale" Aktivität der Nierenlactatdehydrogenase des Meerschweinchens

| Versuch No. | Extinctionszuwachs<br>$\Delta e/\text{min}$ | mg N/ml Homogenat | Aktivität in<br>mE/mg N<br>( $\mu\text{Mol NADH}/\text{mgN}/\text{min}$ ) |
|-------------|---------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 1           | 0.007                                       | 0.90              | 14.100                                                                    |
| 2           | 0.010                                       | 1.40              | 13.000                                                                    |
| 3           | 0.010                                       | 1.40              | 13.000                                                                    |
| 4           | 0.013                                       | 1.60              | 14.800                                                                    |
| 5           | 0.010                                       | 1.35              | 13.400                                                                    |
| 6           | 0.010                                       | 1.23              | 14.800                                                                    |
| 7           | 0.013                                       | 1.85              | 12.800                                                                    |
| 8           | 0.015                                       | 1.95              | 14.000                                                                    |
| 9           | 0.016                                       | 2.00              | 14.550                                                                    |

Aus den 9 Einzelmessungen errechnet sich die mittlere Aktivität der Nieren-Lactatdehydrogenase zu:

$$\bar{x}_1 = 13.600 \text{ mE/mg N}$$

Der mittlere Fehler der Einzelmessungen ( $sx_1$ ) und der mittlere Fehler des Mittelwertes ( $s\bar{x}_1$ ) betragen:

$$sx_1 = \pm 830 \text{ mE/mg N}$$

$$s\bar{x}_1 = \pm 277 \text{ mE/mg N}$$

### 2.3.2.3.2. Aktivitätsbestimmung der Nierenlactatdehydrogenase nach Injektion von Trasylol (R)-

Die intraperitoneal injizierte Dosis betrug einheitlich bei allen 12 Versuchstieren etwa 100.000 KIE/kg. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

Tab. 16: Aktivitäten der Nieren-Lactatdehydrogenase nach i.p. Injektion von 50.000 KIE in Abhängigkeit von der intravitalen Wirkzeit.

| Intravitale Wirkzeit d. TRASYLOL | Extinctionszuwachs $\Delta e/\text{min}$ | mg N/ml Homogenat | Aktivität in $\text{mE}/\text{mg N}$ ( $\mu\text{Mol NADH}/\text{mgN}/\text{min}$ ) |
|----------------------------------|------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 0.5 h                            | 0.013                                    | 1.85              | 12.800                                                                              |
| 0.5 h                            | 0.014                                    | 2.35              | 10.900                                                                              |
| 0.5 h                            | 0.015                                    | 2.04              | 13.400                                                                              |
| 1 h                              | 0.013                                    | 1.82              | 13.000                                                                              |
| 1 h                              | 0.017                                    | 1.76              | 17.500                                                                              |
| 1 h                              | 0.015                                    | 2.04              | 13.400                                                                              |
| 2 h                              | 0.014                                    | 1.82              | 14.000                                                                              |
| 2 h                              | 0.0125                                   | 1.68              | 13.600                                                                              |
| 3 h                              | 0.016                                    | 2.10              | 13.900                                                                              |
| 3 h                              | 0.0165                                   | 2.10              | 14.300                                                                              |
| 5 h                              | 0.015                                    | 2.02              | 13.500                                                                              |
| 5 h                              | 0.013                                    | 1.62              | 14.600                                                                              |

Aus den 12 Einzelmessungen wurde der Mittelwert ( $\bar{x}_2$ ) bestimmt:

$$\bar{x}_2 = 13.700 \text{ mE}/\text{mg N}$$

Zur Beurteilung der Genauigkeit der Messungen wird der mittlere Fehler der Einzelmessungen ( $s_{x_1}$ ) und der mittlere Fehler des Mittelwertes ( $s_{\bar{x}_2}$ ) angegeben:

$$s_{x_1} = \pm 1.500 \text{ mE}/\text{mg N}$$

$$s_{\bar{x}_2} = \pm 430 \text{ mE}/\text{mg N}$$

### 2.3.2.3.3. Vergleich der "normalen" Aktivität der Nieren-Lactatdehydrogenase mit der Trasylolmeßreihe

Bei Anwendung des "t-Testes" ergibt sich wegen

$$D = \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 100 \text{ mE/mg N (Differenz der Mittelwerte)u.}$$

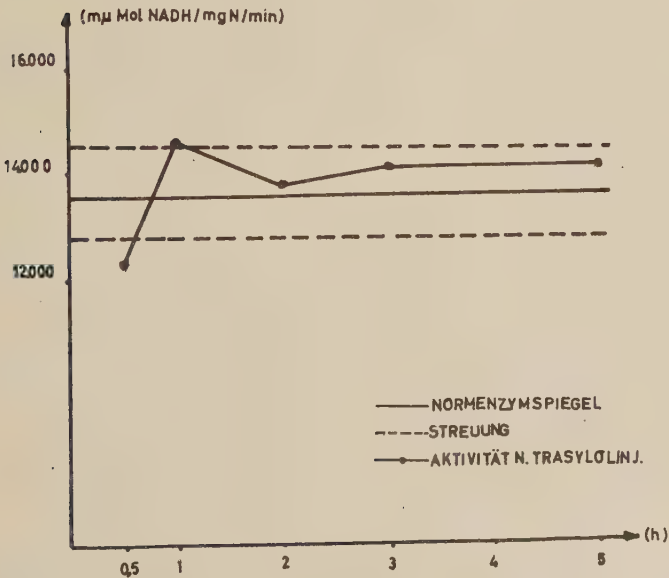
$$s_D = \sqrt{(s\bar{x}_1)^2 + (s\bar{x}_2)^2} = 512 \text{ mE/mg N}$$

$$t = \frac{D}{s_D} = 0.20$$

Nach der Tabelle über die t-Verteilung entspricht dieser Wert einem  $p > 0.05$ . Das bedeutet, es besteht kein Grund, die Differenz zwischen beiden Meßreihen nicht als zufällig anzusehen.

Abbildung 8 stellt die Ergebnisse der Nieren-Lactatdehydrogenase graphisch dar.

Abb. 8: "Normale" Aktivität der Nieren-Lactatdehydrogenase und ihre Streuung. Die Aktivitäten nach Trasylolinjektion sind in Abhängigkeit von der intravitralen Wirkzeit aufgetragen.



### 2.3.2.3.4. Bestimmung der "normalen" Aktivität der Leber-Lactatdehydrogenase

Die Enzymaktivitäten wurden bei 7 Versuchstieren gemessen. Die aus den Organhomogenaten gewonnenen Enzymlösungen wurden im Verhältnis 1:100 mit 0.9%-iger NaCl-Lösung verdünnt, bevor sie in die Reaktion eingesetzt wurden. In Tabelle 17 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 17: "Normale" Aktivität der Leber-Lactatdehydrogenase des Meerschweinchens

| Versuch No. | Extinctionszuwachs $\Delta e/\text{min}$ | mg N/ml Homogenat | Aktivität in mE/mg N<br>( $\mu\text{Mol NADH}/\text{mg N}/\text{min}$ ) |
|-------------|------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 1           | 0.016                                    | 1.84              | 7.900                                                                   |
| 2           | 0.020                                    | 2.34              | 7.800                                                                   |
| 3           | 0.019                                    | 2.20              | 7.860                                                                   |
| 4           | 0.017                                    | 2.40              | 6.400                                                                   |
| 5           | 0.020                                    | 2.50              | 7.250                                                                   |
| 6           | 0.016                                    | 2.30              | 6.350                                                                   |
| 7           | 0.017                                    | 1.65              | 9.350                                                                   |

Aus den 7 Einzelmessungen errechnet sich die mittlere Aktivität der Leber-Lactatdehydrogenase zu:

$$\bar{x}_1 = 7.650 \text{ mE/mg N}$$

Der mittlere Fehler der Einzelmessungen ( $sx_1$ ) und der mittlere Fehler des Mittelwertes betragen:

$$sx_1 = \pm 1.030 \text{ mE/mg N}$$

$$s\bar{x}_1 = \pm 390 \text{ mE/mg N}$$

2.3.2.3.5. Aktivitätsbestimmung der Leber-Lactatdehydrogenase nach Injektion von Trasylol (R)

Die intraperitoneal injizierte Dosis betrug einheitlich bei allen 12 Versuchstieren etwa 100.000 KIE/kg. In Tabelle 18 sind die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

Tab. 18: Aktivitäten der Leber-Lactatdehydrogenase nach i.p. Injektion von 50.000 KIE in Abhängigkeit von der intravitalen Wirkzeit

| Intravitale<br>Wirkzeit d.<br>TRASYLOL | Extinctions-<br>zuwachs<br>$\Delta e/\min$ | mg N/ml<br>Homogenat | Aktivität in<br>mE/mg N<br>( $\mu\text{Mol NADH}/\text{mgN}/\min$ ) |
|----------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 0.5 h                                  | 0.019                                      | 2.20                 | 7.850                                                               |
| 0.5 h                                  | 0.014                                      | 1.89                 | 6.750                                                               |
| 0.5 h                                  | 0.020                                      | 2.15                 | 8.500                                                               |
| 1 h                                    | 0.025                                      | 3.22                 | 7.050                                                               |
| 1 h                                    | 0.024                                      | 2.44                 | 8.950                                                               |
| 1 h                                    | 0.024                                      | 2.40                 | 9.100                                                               |
| 2 h                                    | 0.016                                      | 2.10                 | 6.950                                                               |
| 2 h                                    | 0.014                                      | 2.04                 | 6.300                                                               |
| 3 h                                    | 0.019                                      | 2.70                 | 6.400                                                               |
| 3 h                                    | 0.018                                      | 2.36                 | 6.950                                                               |
| 5 h                                    | 0.019                                      | 2.14                 | 8.100                                                               |
| 5 h                                    | 0.010                                      | 1.35                 | 6.750                                                               |

Aus den 12 Einzelmessungen errechnet sich der Mittelwert ( $\bar{x}_2$ ) zu:

$$\bar{x}_2 = 7.470 \text{ mE/mg N}$$

Der mittlere Fehler der Einzelmessungen ( $s_{x_1}$ ) und der mittlere Fehler des Mittelwertes betragen:

$$s_{x_1} = \pm 1000 \text{ mE/mg N}$$

$$s_{\bar{x}_2} = \pm 290 \text{ mE/mg N}$$

### 2.3.2.3.6. Vergleich der "normalen" Aktivität der Leber-Lactatdehydrogenase mit der Trasylolmeßreihe

Bei Anwendung des "t-Testes" ergibt sich wegen

$$D = \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 180 \text{ mE/mg N (Differenz der Mittelwerte)u.}$$

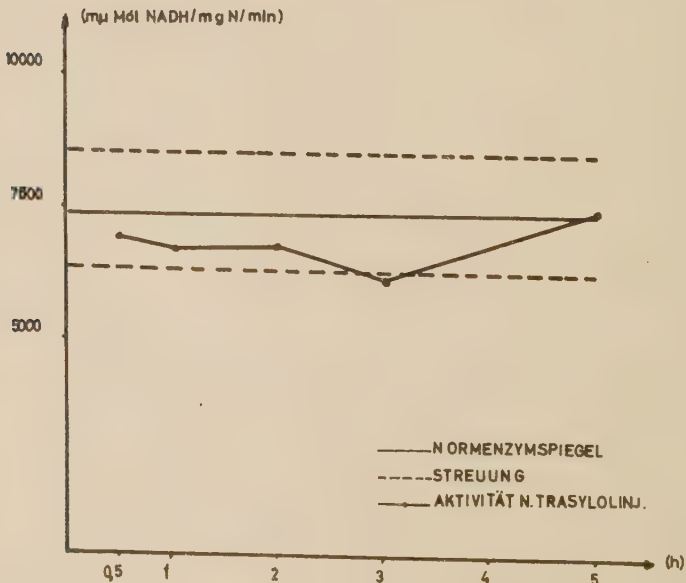
$$s_D = \sqrt{(s\bar{x}_1)^2 + (s\bar{x}_2)^2} = 490 \text{ mE/mg N}$$

$$t = \frac{D}{s_D} = 0.37$$

Nach der Tabelle über die t-Verteilung entspricht dieser Wert einem  $p > 0.05$ . Das bedeutet, es besteht kein Grund, die Differenz zwischen beiden Meßreihen nicht als zufällig anzusehen.

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse der Leber-Lactatdehydrogenase graphisch dargestellt.

Abb. 9: "Normale" Aktivität der Leber-Lactatdehydrogenase und ihre Streuung. Die Aktivitäten nach Trasylolinjektion sind in Abhängigkeit von der intravitalen Wirkzeit aufgetragen.



### 2.3.2.3.7. Bestimmung der "normalen" Aktivität der Lungen-Lactatdehydrogenase

Die Enzymaktivitäten wurden bei 7 Versuchstieren gemessen. Die aus den Organhomogenaten gewonnenen Enzymlösungen wurden im Verhältnis 1:50 mit 0.9%-iger NaCl-Lösung verdünnt, bevor sie in die Reaktion eingesetzt wurden. In Tabelle 19 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 19: "Normale" Aktivität der Lungen-Lactatdehydrogenase des Meerschweinchens

| Versuch No. | Extinctionszuwachs $\Delta e/\text{min}$ | mg/N/ml Homogenat | Aktivität in $\frac{\text{mE}}{\text{mg N}}$ ( $\mu\text{Mol NADH}/\text{mg N}/\text{min}$ ) |
|-------------|------------------------------------------|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1           | 0.0095                                   | 0.60              | 7.200                                                                                        |
| 2           | 0.0105                                   | 0.73              | 6.550                                                                                        |
| 3           | 0.008                                    | 0.38              | 9.600                                                                                        |
| 4           | 0.008                                    | 0.48              | 7.600                                                                                        |
| 5           | 0.007                                    | 0.49              | 6.500                                                                                        |
| 6           | 0.0075                                   | 0.50              | 6.820                                                                                        |
| 7           | 0.010                                    | 0.60              | 7.650                                                                                        |

Aus den 7 Einzelmessungen errechnet sich die mittlere Aktivität der Lungen-Lactatdehydrogenase zu:

$$\bar{x}_1 = 7.420 \text{ mE/mg N}$$

Der mittlere Fehler der Einzelmessungen ( $sx_1$ ) und der mittlere Fehler des Mittelwertes ( $s\bar{x}_1$ ) betragen:

$$sx_1 = \pm 1.100 \text{ mE/mg N}$$

$$s\bar{x}_1 = \pm 415 \text{ mE/mg N}$$

### 2.3.2.3.8. Aktivitätsbestimmung der Lungen-Lactatdehydrogenase nach Injektion von Trasylol (R)

Die intraperitoneal injizierte Dosis betrug einheitlich bei allen 12 Versuchstieren etwa 100.000 KIE/kg. In Tabelle 20 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 20: Aktivitäten der Lungen-Lactatdehydrogenase nach Injektion von 50.000 KIE in Abhängigkeit von der intravitalen Wirkzeit.

| Intravitale Wirkzeit d. TRASYLOL | Extinctions-<br>zuwachs<br>$\Delta e/\text{min}$ | mg N/ml<br>Homogenat | Aktivität in<br>mE/mg N<br>( $\mu\text{Mol NADH}/\text{mg N}/\text{min}$ ) |
|----------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| 0.5 h                            | 0.013                                            | 0.90                 | 6.550                                                                      |
| 0.5 h                            | 0.010                                            | 0.68                 | 6.700                                                                      |
| 0.5 h                            | 0.007                                            | 0.42                 | 7.600                                                                      |
| 1 h                              | 0.010                                            | 0.67                 | 6.800                                                                      |
| 1 h                              | 0.0125                                           | 0.74                 | 7.700                                                                      |
| 1 h                              | 0.006                                            | 0.48                 | 5.700                                                                      |
| 2 h                              | 0.0105                                           | 0.72                 | 6.650                                                                      |
| 2 h                              | 0.006                                            | 0.39                 | 7.000                                                                      |
| 3 h                              | 0.013                                            | 1.01                 | 5.850                                                                      |
| 3 h                              | 0.011                                            | 0.81                 | 6.500                                                                      |
| 5 h                              | 0.008                                            | 0.49                 | 7.400                                                                      |
| 5 h                              | 0.008                                            | 0.48                 | 7.600                                                                      |

Aus den 12 Einzelmessungen errechnet sich der Mittelwert ( $\bar{x}_2$ ) zu:

$$\bar{x}_2 = 6.840 \text{ mE/mg N}$$

Der mittlere Fehler der Einzelmessungen ( $sx_1$ ) und der mittlere Fehler des Mittelwertes ( $s\bar{x}_2$ ) betragen:

$$sx_1 = \pm 650 \text{ mE/mg N}$$

$$s\bar{x}_2 = \pm 188 \text{ mE/mg N}$$

### 2.3.2.3.9. Vergleich der "normalen" Aktivität der Lungen-Lactatdehydrogenase mit der Trasylolmeßreihe

Bei Anwendung des "t-Testes" ergibt sich wegen

$$D = \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 580 \text{ mE/mg N (Differenz der Mittelwerte)u.}$$

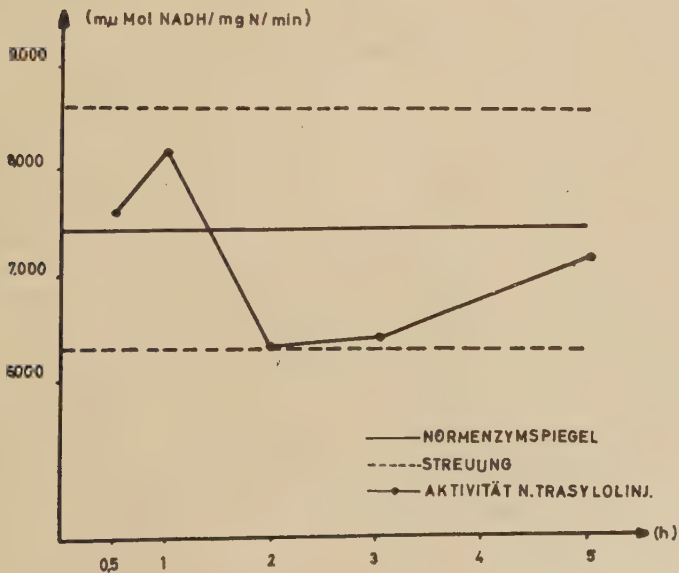
$$s_D = \sqrt{(s\bar{x}_1)^2 + (s\bar{x}_2)^2} = 460 \text{ mE/mg N}$$

$$t = \frac{D}{s_D} = 1.26$$

Nach der Tabelle über die t-Verteilung entspricht dieser Wert einem  $p > 0.05$ . Das bedeutet, es besteht kein Grund, die Differenz zwischen beiden Meßreihen als nicht zufällig anzusehen.

Abbildung 10 stellt die Ergebnisse der Lungen-Lactatdehydrogenase graphisch dar.

Abb. 10: "Normale" Aktivität der Lungen-Lactatdehydrogenase und ihre Streuung. Die Aktivitäten nach Trasylolinjektion sind in Abhängigkeit von der intravitalen Wirkzeit aufgetragen.



### 2.3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Eine Beeinflussung der unspezifischen sauren oder alkalischen Phosphatasen bzw. der Lactatdehydrogenase in Leber, Lunge oder Niere des Meerschweinchens durch intraperitoneale Injektion von 50.000 Kallikreinaktivatoreinheiten konnte statistisch nicht gesichert werden.

SAMEJIMA u.a. (74) geben an, daß die Aktivität der alkalischen Serumphosphatase des Hundes unter Trasyloltherapie sinkt. Es ist deswegen bemerkenswert, daß wir 1 bzw. 2 Stunden nach Injektion des Kallikreinaktivators - d.h. zu dem Zeitpunkt des wahrscheinlich höchsten Trasylolspiegels - in Leber und Lunge relativ niedrige Aktivitäten dieses Enzyms gemessen haben. Wegen der geringen Anzahl an Versuchen läßt sich dieser Befund aber nicht sichern.

Die für die alkalischen Phosphatasen ermittelten absoluten Aktivitäten lassen sich nur schwer mit den Angaben in der einschlägigen Literatur vergleichen, da wir im Gegensatz zu anderen Autoren das Enzym nicht durch Magnesium-Ionen aktiviert haben (siehe hierzu die Arbeiten von ALBERS, 5; CLOETENS, 19; BAMANN, 10).

CASTELLA (18) hat bereits vor uns die unspezifischen sauren Phosphatasen in verschiedenen Organen des Meerschweinchens gemessen. Der Autor gibt die Enzymaktivitäten allerdings in Bodansky-Einheiten an und bezieht sie auf 100 g Frischgewebe. Deshalb ist nur bedingt ein Vergleich der Aktivitätsverhältnisse der verschiedenen Organe zueinander möglich: Entgegen der Beobachtung von CASTELLA lag in unseren Versuchen die Aktivität der sauren Lungenphosphatase (104  $\mu$ P/mg N/h) in derselben Größenordnung wie die saure Leberphosphatase (118  $\mu$ P/mg N/h). Den Befund des genannten Autors, daß die saure Nierenphosphatase (195  $\mu$ P/mg N/h) eine etwa doppelt so hohe Aktivität aufweist wie die saure Leberphosphatase, konnten

wir dagegen bestätigen. Auch die Angabe, daß die saure Phosphatase der Leber von vielen bisher untersuchten Tieren die Aktivität der alkalischen Phosphatase übertrifft (vgl. DAVIES, 23; KOCHAKIAN u. FOX, 40; ROSENMUND, 73), was im Gegensatz zu Befunden an anderen Organen steht, konnten wir belegen ( $118 \text{ } \mu\text{P/mg N/h}$  :  $11 \text{ } \mu\text{P/mg N/h}$ ).

Zum Vergleich der von uns gemessenen Aktivitäten der Lactatdehydrogenasen (Leber:  $7650 \text{ mE/mg N}$ ; Lunge:  $7420 \text{ mE/mg N}$ ; Niere:  $13600 \text{ mE/mg N}$ ) werden die Aktivitäten wiedergegeben, die WROBLEWSKI und Mitarbeiter (77) in den entsprechenden Organen des Kaninchens gefunden haben: (Die Umrechnung der Wroblewski-Einheiten in Standard-Einheiten erfolgte durch Multiplikation mit dem Faktor 0.482). Niere:  $9650 \text{ mE/mg N}$ ; Lunge:  $6770 \text{ mE/mg N}$ ; Leber:  $26500 \text{ mE/mg N}$ .

### 3. DISKUSSION

Im Anschluß an unsere experimentellen Befunde soll der Versuch unternommen werden, durch eine knappe und keinesfalls vollständige Betrachtung von Aufbau, Wirkungsweise und Hemmungsmechanismen der untersuchten Enzyme die theoretischen Möglichkeiten einer Inhibition durch den Kallikreininaktivator wenigstens in Umrissen abzuschätzen.

#### 3.1. Die alkalischen Phosphatasen (22, 24, 72)

1938 entwickelten ALBERS u. Mitarb. (6) die Vorstellung, daß sich die Phosphatasen im wesentlichen durch das Apoferment unterscheiden. Dagegen sollen sie das gleiche, zumindest aber ein ähnliches Coenzym besitzen. Nach dieser Auffassung bestimmt das Apoferment die Lage des Aktivitätsmaximums wie auch die Substratspezifität, während die Wirkungsspezifität dem Coferment zugeschrieben wird. Die genannten Autoren glauben, daß das Coferment in Abhängigkeit von dem vorliegenden pH-Wert z.B. zwischen saurer und alkalischer Nierenapophosphatase verschoben werden kann.

KUTSCHER u. SIEG (45) konnten aus dem Dialysat von Muskel- und alkalischer Nierenphosphatase die gesuchte Cophosphatase isolieren. Die chemische Analyse ergab, daß es sich um Cholinphosphorsäure oder eine verwandte Verbindung handeln muß. TAMAYO u. MUNICIO (84) fassen dagegen die kristallisierte Nierencophosphatase als die Magnesiumverbindung eines Diphosphonucleotids auf. Auch Histidin (4) und andere Verbindungen (6) wurden als Bestandteil der Cophosphatase gefunden.

Gegen die dargestellten Befunde sprechen Untersuchungen von SCHRAMM u. Mitarb. (75) an weitgehend gereinigten Enzympräparaten sowie die Angabe von ROCHE und THOAI (72), daß das UV-Spektrum der Phosphatasen dem von vielen Nicht-

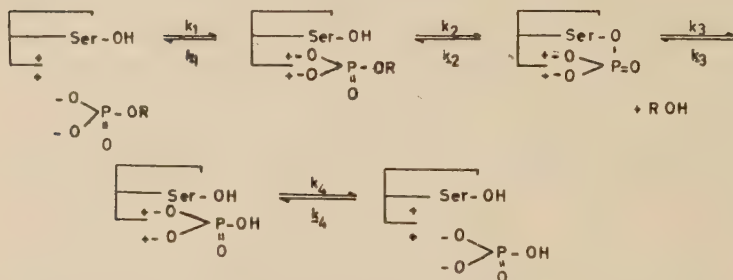
Enzym-Proteinen entspricht. Auf die Gegenwart eines Constituenten, der als Coenzym wirken könnte, kann daraus nicht geschlossen werden. Diese Autoren glauben, daß die Esterspaltung durch ein aktives Zentrum des Enzyms bewirkt wird, oder daß jeder Substrattyp an einer bestimmten Position des Enzyms angelagert wird.

Für die Funktion des notwendigen 2-wertigen Metalls geben COURTOIS und PERLES (22) verschiedene Möglichkeiten an:

1. Das Metall dient als Bindeglied zwischen Holoferment und Substrat oder
2. zwischen Apo- und Coferment.
3. Vielleicht gehen die Metalle Bindungen mit den Aminogruppen ein, die für die Aktivität der alkalischen Phosphatasen unentbehrlich zu sein scheinen, wie aus Versuchen mit aminogruppenspezifischen Inhibitoren hervorgeht (72, 2).
4. Es sei in diesem Zusammenhang angeführt, daß Metallionen, insbesondere seltene Erden, die sonst im alkalischen Milieu stabilen Phosphorsäureester spalten können (BAMANN, 12).

Eine Zusammenfassung der neueren Anschauung über den Wirkungsmechanismus findet sich in einer Abhandlung von HUMMEL und KALNITSKY (34). Die Befunde wurden vorwiegend von *E. Coli* gewonnen: Das Enzym soll aus zwei identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils 40.000 bestehen und 2 Zinkatome binden. Man erwartet deswegen 2 aktive Zentren, in die Serin einbezogen sein soll. Nach MORTON (59) und SCHWARTZ (76A) läßt sich der Wirkungsmechanismus, der bei allen phosphorilytisch wirksamen Fermenten in ähnlicher Weise ablaufen soll, wie folgt formulieren:

Abb. 11: Wirkungsmechanismus der alkalischen Phosphatase (mod. nach SCHWARTZ)



Das Zink dient innerhalb dieser Reaktion wahrscheinlich als Bindeglied und macht den Phosphormonoester oder das Orthophosphat für die Hydroxylgruppe des Serins zugänglich.

Welche Hemmungsmechanismen sind bei der alkalischen Phosphatase bekannt und wie lassen sie sich mit dem entworfenen Bild in Übereinstimmung bringen?

Grundsätzlich unterscheiden wir 3 Arten der Inhibition: eine competitive, eine nicht competitive und eine uncompetitive Hemmung (24).

Bei der competitiven Hemmung weisen der Inhibitor und das physiologische Substrat eine chemische Verwandtschaft auf. Beide Substanzen haben eine ähnliche Affinität zum Ferment. Sie concurrieren um die Haftstellen am Enzym, ohne daß sie notwendig umgesetzt würden. Die Hemmung kann durch Erhöhung der Substratkonzentration aufgehoben werden.

Eine Hemmung 1. Art, wie die competitive Inhibition auch genannt wird, kann bedingt sein durch Komplexbildner, durch das Reaktionsprodukt, durch Inhibition der Cofaktoren, sowie durch Stoffe, die einen Substratkomplex bilden und damit das Substrat für das Enzym unangreifbar machen.

Zu der Gruppe der Komplexbildner gehören im Falle der alkalischen Phosphatasen Äthylmercaptan, Thiole, Sulfite, Ascorbinsäure, die Alkalicyanide, Cystein und das Glutathion, um nur einige zu nennen. Die hemmende Wirkung dieser Stoffe ist abhängig von der Konzentration des Effektores und dem Ursprungsort der Enzyme (72), ein Hinweis darauf, daß die alkalischen Phosphatasen kein einheitliches Ferment bzw. die metallischen Aktivatoren nicht identisch sind. Außer den erwähnten Reduktionsmitteln werden auch Na-diäthylthiocarbamat, Phenanthrolin,  $\alpha, \alpha'$ -Dipyridyl und die Wolframate zu dieser Klasse von Inhibitoren gerechnet. Der Mechanismus beruht entweder auf der Blockierung der Metalle durch Bildung eines inaktiven Enzym-Metall-Inhibitor-Komplexes oder bei den organischen Verbindungen auf der Abtrennung des Katjons vom Enzymprotein in Form eines Komplexes (71). Daß Fluoride, Oxalate und Gallensäuren nur gelegentlich als Hemmstoffe wirken (26), versuchen ROCHE und THOAI (72) dadurch zu erklären, daß sich der metallische Constituent schon physiologischerweise aus einer Mischung verschiedener Metalle zusammensetzt, unter denen das Magnesium stark überwiegt, während in diesen speziellen Enzympräparationen nur Magnesium anwesend sein soll. Die competitive Hemmung durch Orthophosphate ist allen Phosphatasen gemeinsam, soweit das Orthophosphat als normales Reaktionsprodukt auftritt. Ebenso spielen die Arsenate, die den Phosphaten chemisch nahe stehen, als Inhibitoren 1. Art eine Rolle.

Bei den nicht competitiven Hemmstoffen (24) liegt eine Herabsetzung der Zerfallsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes vor, die unabhängig von der Substratkonzentration ist. Auch die Hemmstoffe dieser Gruppe, die sogenannten Inhibitoren 2. Art, haben eine gewisse Affinität zu den Fermenten, doch besetzen sie wahrscheinlich nicht die prosthetischen Gruppen. Die Hemmung durch Inhibitoren 2. Art kann reversibel sein.

Nitrite, Phenylisocyanat, Formaldehyd und Keten inhibieren die alkalische Phosphatase durch Blockierung oder Zerstörung der Aminogruppen (33, 70, 3). Keten ist außerdem hydroxylgruppenspezifisch; möglicherweise reagiert es auch mit den Thiolgruppierungen (33, 72). WALSCH und WALSCH (85) konnten feststellen, daß auch Monojodessigsäure und Bleiphenylnitrat inhibitorisch wirken. Da Cystein ein Antagonist zu diesen Stoffen ist, darf gefolgert werden, daß die Thiolgruppen die Angriffspunkte dieser Hemmstoffe sind.

Zu den uncompetitiven Hemmstoffen (24) werden insbesondere Destruktoren gezählt, wie eiweißfällende Substanzen, die Hitzeinaktivierung und jonisierende Strahlen, Auch die Fermenthemmung durch Antikörperbildung muß nach dieser Einteilung hierher gerechnet werden.

In welche Gruppe von Inhibitoren könnte der Kallikreinaktivator eingereiht werden?

Die competitive Hemmung setzt per definitionem eine chemische Ähnlichkeit des Effektors mit dem physiologischen Substrat voraus. Diese Bedingung ist im Falle des Kallikreinaktivators und der alkalischen Phosphatase nicht erfüllt. Die genannte Voraussetzung besteht aber nicht bezüglich einer Reaktion mit dem Cofaktor. Es ist deshalb zu erwägen, ob Magnesium oder ein anderes zweiwertiges Metalljon mit dem Protein Trasylol (R) in Abhängigkeit von dem aktuellen pH-Wert eine undissoziierte Bindung eingehen und den Cofaktor dadurch dem Ferment entziehen kann. Bei der vorliegenden Versuchsanordnung konnten wir diese Möglichkeit nicht experimentell überprüfen.

Als Beispiele einer uncompetitiven Hemmung haben wir OH-, SH-, und NH<sub>2</sub>-Gruppen spezifische Substanzen angeführt. Der Kallikreinaktivator weist als Protein die

gleichen reagiblen Gruppen wie das Enzym auf. Eine spezielle Wirkung auf Hydroxyl-, Sulfhydryl- oder Amino-Gruppen der alkalischen Phosphatasen ist deshalb unwahrscheinlich. Dies schließt aber nicht generell die Möglichkeit einer Reaktion der Eiweißkörper untereinander aus, die gleichermaßen von Primär-, Secundär- und Tertiärstruktur, d.h. von der Aminosäureensequenz, der Ladungsverteilung, der "Oberfläche" der Eiweißkörper usw. abhängt.

Eine nicht kompetitive Hemmung durch unspezifische Destruktion des Fermenteiweißes kann in unserem Zusammenhang grundsätzlich ausgeschlossen werden. Dagegen ist die Frage einer Antigen-Antikörper- bzw. Enzym-Antienzym-Reaktion von Interesse.

ROBERT und POLONOWSKI (22B) ordnen die makromolekularen Inhibitoren im Gegensatz zu DIRSCHERL und AMMON (24) in eine eigene Gruppe ein. Diese Gruppe umfaßt die Antienzyme - das sind die Antikörper, die gegen die Enzyme gerichtet sind -, außerdem gewisse spezifische Inhibitoren und zahlreiche synthetische oder natürliche Polymere, die die Fähigkeit haben, gewisse Enzyme zu hemmen.

Einige Reaktionen sind sehr spezifisch, wie die zwischen Enzym und Antienzym oder zwischen dem spezifischen Sojabohneninhibitor und dem Trypsin (22B).

Wichtig ist, daß keineswegs alle durch Immunisation erhaltenen Antienzyme die Enzyme obligatorisch hemmen (CINADER, 22C). Dieser Befund kann dadurch erklärt werden, daß nicht immer das aktive Zentrum auch Träger der antigenen Eigenschaften ist (22B).

Der Kallikreinaktivator muß zweifellos in diese letzte Klasse von Inhibitoren eingeordnet werden: Der Wirkstoff des Trasylols (R) ist wenigstens im Falle des Kallikreins als spezifisches Antienzym bzw. spezifischer Inhibitor anzusehen, der seine Wirkung an den aktiven Zen-

tren oder in ihrer Nachbarschaft entfaltet. Wahrscheinlich gilt dies aber ebenso für das Trypsin, Chymotrypsin sowie das Plasmin oder andere Proteasen, die durch den Kallikreinaktivator beeinflusst werden. Vielleicht haben die Zentren dieser Enzyme alle untereinander eine gewisse Ähnlichkeit, wie es für einige unter ihnen von WERLE (87) gefordert wurde und für das Trypsin und Chymotrypsin bereits bewiesen ist (vgl. COHEN, OSTERBAAN, JANSZ, BEREND, 21).

In einer Arbeit von SCHWARTZ u. Mitarb. (76) findet sich die interessante Mitteilung, daß die Aminosäuresequenz in der Nähe des aktiven Serinrestes der alkalischen Phosphatasen von E. Coli den Sequenzen ähnlich ist, die im Zentrum anderer Hydrolasen gefunden wurden. Zum Vergleich geben wir eine modifizierte Tabelle nach SCHWARTZ et al. wieder:

Tab. 21: Aminosäuresequenzen in der Nähe des aktiven Serinrestes mehrerer Hydrolasen

| ENZYM                  | AKTIVES ZENTRUM             |
|------------------------|-----------------------------|
| Alkalische Phosphatase | Thr - Asp - Ser - Ala - Ala |
| Chymotrypsin           | Gly - Asp - Ser - Gly - Gly |
| Trypsin                | Gly - Asp - Ser - Gly - Pro |
| Pseudocholinesterase   | Gly - Glu - Ser - Ala - Gly |
| Leberaliesterase       | Gly - Glu - Ser - Ala - Gly |

Für eine Ähnlichkeit des aktiven Zentrums von Trypsin, Chymotrypsin und der alkalischen Phosphatase spricht auch die Tatsache, daß die Hydroxylgruppe des Serins bei den

genannten Fermenten durch Diisopropylfluorophosphat markiert, bzw. das Enzym inhibiert werden kann (vgl. COHEN et al., 21; WEBB, 86). Die sauren Phosphatasen werden durch diesen Stoff nicht beeinflusst (86).

Es darf aber nicht übersehen werden, daß die Eigenschaften der Hydroxylgruppe des Serins offensichtlich in verschiedenartigster Weise durch die umgebenden Aminosäuren und insbesondere durch strukturelle Merkmale der Molekülumgebung modifiziert werden (SCHWARTZ, 76B). So fällt auf, daß die Phosphorilierung durch anorganisches Phosphat für die alkalische Phosphatase spezifisch zu sein scheint: Unter anderem konnte in den Säurehydrolysaten von  $\alpha$ -Chymotrypsin, dem Phosphat zugesetzt worden war, kein Serinphosphat gefunden werden (76B), wie es bei einer Wirkungsähnlichkeit der aktiven Zentren der beiden erwähnten Enzyme zu erwarten gewesen wäre.

#### Zusammenfassung:

Ist die Hemmung der genannten Proteasen durch den Kallikreinaktivator tatsächlich im Sinne einer an den aktiven Zentren lokalisierten Enzym-Antienzym-Reaktion relativ spezifisch, dann erscheint trotz der beschriebenen Befunde eine Beeinflussung der alkalischen Phosphatasen zumindest fraglich, wenn auch keine endgültigen Aussagen gemacht werden können, da die Kräfte, die bei der Bindung zwischen den makromolekularen Inhibitoren und den entsprechenden Fermenten eine Rolle spielen, bisher nur wenig bekannt sind (22A).

Es soll noch bemerkt werden, daß wir in der von uns eingesehenen Literatur keinen Hinweis auf einen unspezifischen Inhibitor von Proteincharakter für die alkalischen Phosphatasen gefunden haben.

Wie ist dann aber der Befund von SAMEJIMA et.al. (74) zu deuten, der bei der therapeutischen Anwendung von Trasylol (R) eine deutliche Abnahme der Aktivität der alkalischen Serumphosphatase des Hundes beschreibt?

Die Hemmung dieses Enzyms wurde im in-vivo-Versuch entdeckt. In-vitro-Versuche wurden von den Autoren nicht durchgeführt, soweit aus dem uns vorliegenden Manuskript hervorgeht.

Es muß deshalb darauf hingewiesen werden, daß seit langem indirekte Beeinflussungen der alkalischen Phosphatase im Serum und verschiedenen Organen insbesondere durch Hormone bekannt sind (1, 7, 38, 64). Es handelt sich dabei wahrscheinlich um hormonbedingte Stoffwechseländerungen (ABDERHALDEN, 1).

Abgesehen von der Tatsache, daß sich Befunde, die einerseits im Serum des Hundes erhoben, andererseits aus Organhomogenaten des Meerschweinchens gewonnen wurden, nicht sicher vergleichen lassen (vgl. ROSENMUND, 73), möchten wir doch zur Discussion stellen, ob eine mögliche Abnahme der alkalischen Phosphataseaktivität unter Trasylol-(R) Therapie nicht auf eine indirekte Umstellung des Stoffwechsels bezogen werden kann.

### 3.2. Die sauren Phosphatasen

Für die sauren Phosphatasen gelten im wesentlichen dieselben Überlegungen, die wir bezüglich der alkalischen Phosphatasen dargestellt haben. Die sauren Phosphatasen zeichnen sich aber u.a. durch zusätzliche, charakteristische Inhibitoren aus. Die im folgenden wiedergegebenen Befunde wurden an verschiedenen Organhomogenaten von Tieren und des Menschen erhoben. Besondere Hinweise auf das Verhalten der sauren Lungenphosphatase finden sich in der einschlägigen Literatur nur selten.

Bei der charakteristischen Hemmung durch Fluoride handelt es sich nach KUTSCHER und WÜST (46) um eine streng competitive Inhibierung, bei der das Substrat vom Ferment abgedrängt wird. OHLMEYER (62) gibt eine Verstärkung der Fluoridwirkung durch Zusatz von Magnesiumjonen oder anderen 2-wertigen Metalljonen an. Die Wirkung soll nur auf der Bildung eines inaktiven Phosphatase-Magnesium-Fluorid-Gemisches beruhen (63). Nach COURTOIS und ANAGNOSTOPOULOS (22A) liegt eine energetische Inhibition vor, bei der wahrscheinlich ein komplexer Mechanismus abläuft. Die Autoren weisen nach, daß die Hemmung von der Wirkstoffkonzentration, aber nicht von der Menge des zugeführten Fluorides abhängt. Es bildet sich eine dissoziabile Verbindung, infolgedessen kommt es nicht zum Ausfall eines Metalljons. Die Bildung eines metallischen Katjonenblockes lehnen diese Autoren ab, weil gesättigte Lösungen von Ca-, Mg-, oder Zn-fluorid die gleiche Hemmwirkung zeigen, wie äquivalente Mengen von Na-fluorid.

Auch die Hemmung durch Molybdate ist für die saure Phosphatase relativ spezifisch. Das Molybdat haftet am Enzym und bildet eine Verbindung, die keine enzymatische Aktivität aufweist. Die Inhibierung ist durch concurrierende Bindung des Molybdates oder durch Dialyse reversibel. COURTOIS u. ANAGNOSTOPOULOS (22A) konnten diese Ergebnisse verallgemeinern. Sie zeigten, daß auch andere Mineralsäuren mit hohem Molekulargewicht, die ebenfalls Komplexbildner sind, sich wie Molybdansäure verhalten: Wolframsäure, Phosphorwolframsäure, Metavanadinsäure, Uranylacetat. Die Zugabe von Phosphat setzt die Hemmung durch Molybdat wieder herab.

Die für verschiedene Klassen der Phosphatasen gemeinsame competitive Hemmung durch Orthophosphate haben wir bereits weiter oben erwähnt. Die relative Phosphathemmung ist abhängig vom Verhältnis Substrat zu Orthophosphat (JACOBSEN, 35).

Eine uncompetitive Hemmung durch Denaturierung der Leberphosphatasen kann mit Hilfe organischer Solventien wie Alkohol, Äther oder Aceton herbeigeführt werden (63).

Phenylisocyanat (70) und salpetrige Säure (AURICCHIO u. BACCARI, 9) bewirken wie bei der alkalischen Phosphatase eine Hemmung durch Reaktion mit den Aminogruppen. Ebenso sind hydroxyl- und sulfhydrylgruppenspezifische Inhibitoren bekannt. OHLMEYER versuchte daraus abzuleiten, daß es sich bei den sauren Phosphatasen um ein SH-Ferment handelt.

Der letztgenannte Autor gibt auch eine Inhibierung durch DNS an, die durch Proteinzugabe oder pH-Änderung reversibel ist (64). Außerdem sind Hemmungen durch Malonat (AUBEL u.a., 8), Fumarat und Tartrat (LUNDQUIST, 51) beschrieben. Letztere ist configurationsabhängig (ABULFADL u. KING, 2)

Oxydationsmittel mit einem Redoxpotential von über 400 mV führen bei der sauren Nierenphosphatase eine durch Dialyse und Reduktionsmittel teilweise reversible Inhibierung herbei (SIZER, 81). Das gleiche Enzym wird auch durch Physostigmin gehemmt (WEBB, 86), wogegen Diisopropylfluorophosphat (86) und Stilböstrol (2) in vitro die saure Gewebe- und Serumphosphatase nicht zu inhibieren vermögen.

Auf eine Darstellung der mannigfachen Befunde über die biologische Beeinflussung durch Hormone, die alleine von der sauren Leber- und Nierenphosphatase bekannt sind, kann hier verzichtet werden, zumal von verschiedenen Untersuchern bei verschiedenen Versuchstieren recht unterschiedliche Ergebnisse mitgeteilt werden. Eine Zusammenstellung findet sich bei ROSENMUND (73).

Insgesamt gesehen lassen sich auch auf Grund der dargestellten "charakteristischen" Inhibierungsmechanismen

keine weiterreichenden Schlußfolgerungen ziehen als sie bereits anläßlich der alkalischen Phosphatasen erörtert wurden. Immerhin deutet die (allerdings nicht unwidersprochen gebliebene, vgl. 34, 76A) Annahme, in der sauren Phosphatase liege ein sulfhydrylgruppenabhängiges Ferment vor, darauf hin, daß im Gegensatz zur alkalischen Phosphatase keine Ähnlichkeit des aktiven Zentrums mit dem von Trypsin und Chymotrypsin zu erwarten ist. Vielleicht dürfen auch die zum Teil verschiedenartigen Inhibierungsmechanismen in diesem Sinne gedeutet werden.

Es sei noch angefügt, daß wir zu einer ersten Orientierung einen in-vitro-Versuch mit Leber-, Lungen- und Nierenhomogenaten durchgeführt haben. Dabei wurden in die Ansätze jeweils 1, 100 und 1000 KIE eingebracht. Einen Anhaltspunkt für eine direkte Hemmung der sauren Phosphatasen konnten wir auch daraus nicht gewinnen.

### 3.3. Die Lactatdehydrogenase

ist ein Enzym, das in den glykolytischen Abbau der Kohlenhydrate eingeschaltet ist. Es katalysiert die Reaktion



Bisher ging man weitgehend von dem Standpunkt aus, daß Enzyme gleicher Wirkungs- und Substratspezifität identisch seien. Heute weiß man, daß der menschliche Organismus mindestens 5 verschiedene Lactatdehydrogenasen aufbaut, die sogenannten Isozyme. MARKERT (54) entwickelte die inzwischen gut gesicherte These (55), daß diese Isozyme als die fünf möglichen Kombinationen von 2 Unter-einheiten entstehen, die beim Menschen von 2 verschiedenen Genorten abhängig sind. Jedes Isozym ist aus insge-

samt 4 Untereinheiten aufgebaut. Bezeichnet man diese Untereinheiten mit den Chiffren A und B, so lassen sich die 5 Isozyme wie folgt formulieren: AAAA, AAAB, AABB, ABBB, BBBB.

Im Rahmen unserer Fragestellung sollen nur einige Hinweise auf die Hemmung der LDH in vitro gegeben werden.

Eine stark inhibierende Wirkung zeigen quecksilberorganische Verbindungen wie p-Chloromercuribenzoat und Dinitrofluorobenzol. Angriffspunkt dieses Effekfortyps sind die 14 freien Thiolgruppen, von denen 3 - 4 besonders reaktionsfähig und für die enzymatische Wirkung verantwortlich sind (PFLEIDERER, 67). Die Hemmung ist reversibel und kann durch Thiole oder Kaliumcyanid wieder aufgehoben werden. Erst in höherer Konzentration hemmen Jodessigsäure und Phenylmaleinimid (66). Selbst durch hohe Konzentrationen von Metallkomplexbildnern wie Phenantrolin, Dithizon, p-hydroxy-Chinolin und Äthylendiaminotetraessigsäure (EDTA) wird das Enzym nicht inhibiert (65). Ein sehr wirksamer kompetitiver Hemmstoff ist nach SCHWERT u. Mit. (77) das Halbamid der Oxalsäure für die Pyruvathydrierung, während die Oxalsäure selbst die Milchsäuredehydrierung inhibiert. Die Herzmuskelform des Hühnchenembryos (Isozym 5) wird durch Oxalat stärker gehemmt als die Skelettmuskelform (Isozym 1) (KAPLAN u. Mitarb., 32). Für das Verständnis dieser kompetitiven Hemmung ist von Interesse, daß die LDH eine absolute Spezifität bezüglich der L (+) Konfiguration von  $\alpha$ -Hydroxysäuren besitzt. So wird z.B. die D (-) Milchsäure (MS) nicht dehydriert; dagegen werden einige Homologe der MS und BTS durch die LDH unter NAD- bzw. NADH +  $H^+$ -Zusatz enzymatisch umgesetzt, soweit keine Verzweigung der aliphatischen Ketten vorliegt (MEISTER, 57).

Elektrophoretisch langsam wandernde Isozyme werden durch Harnstoff schon in niederen Konzentrationen selektiv inaktiviert, während eine ähnliche Hemmung beim

schnell migrierenden Herzmuskeltyp erst in höheren Konzentrationen auftritt. RICHTERICH (69) versuchte dies zunächst durch Aufbrechen der Wasserstoffbrücken und damit einhergehendem Verlust der Secundärstruktur zu erklären (vgl. PFLEIDERER, 67).

BRAND et al. (17) machten inzwischen darauf aufmerksam, daß die Alkoholdehydrogenase bei niederen Harnstoffkonzentrationen ohne Änderung der Primärstruktur inaktiviert wird. Für dieses Enzym stellt der Harnstoff ein spezifisches Reagenz an der aktiven Gruppe dar.

Nachdem RICHTERICH beobachtet hatte, daß Pyruvat und  $\text{NADH} + \text{H}^+$  eine Schutzwirkung auf die LDH ausüben, vermutet er einen ähnlichen Mechanismus bezüglich der Lactatdehydrogenase.

Aus den dargestellten Befunden geht hervor, daß die LDH eine ausgeprägte Substratspezifität zeigt, daß zur Aktivierung des Enzyms kein Metall benötigt wird und offensichtlich kein gesondertes Coferment vorliegt. Eine competitive Hemmung, die u.a. an die chemische Verwandtschaft von Inhibitor und natürlichem Substrat gebunden ist, braucht deswegen bezüglich des Proteins Trasylol (R) nicht erwogen zu werden.

Für eine nicht competitive und eine uncompetitive Hemmung treffen im wesentlichen die gleichen Überlegungen zu, die bereits bei der alkalischen und sauren Phosphatase angestellt wurden: Der Wirkstoff des Trasylols (R) und die LDH enthalten als Proteine die gleichen reagiblen Gruppen, was die Reaktionsfähigkeit herabsetzt. Gegen eine Bindung des Kallikreinaktivators an den aktiven Zentren der LDH spricht insbesondere, daß im Unterschied zu Trypsin und Chymotrypsin ein "SH-Ferment" vorliegt. Ob diese speziellen Eiweißkörper überhaupt - und wenn ja, welche - Reaktionen untereinander eingehen können, kann nicht einfach beantwortet werden, solange wir

weder Primär-, noch Secundär-oder Tertiärstruktur exakt kennen und die dadurch bedingten Reaktionsverhältnisse nicht sicher überschauen.

So dürfen wir auch bezüglich der Lactatdehydrogenase die theoretische Möglichkeit einer Inhibition nicht ausschließen, wenn es auch auffällig ist, daß wir in der von uns eingesehenen Literatur keinen Hinweis auf einen Inhibitor von Proteincharakter gefunden haben, sofern man von den spezifischen biologischen Antikörpern absieht (KAPLAN et al., 20).

#### 4. ZUSAMMENFASSUNG

In einem einleitenden Abschnitt wurde der Kallikreinaktivator charakterisiert und seine klinische Anwendung besprochen. Da bisher nur eine direkte Hemmwirkung auf proteolytische Fermente bekannt ist, stellten wir uns die Frage, ob der Kallikreinaktivator auch Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels inhibiert.

Bei in-vivo-Versuchen fanden wir keinen statistisch verifizierbaren Einfluß des TRASYLOL (R) auf die alkalischen und sauren Phosphatasen bzw. die Lactatdehydrogenase in Leber, Lunge und Niere des Meerschweinchens.

In einer Discussion versuchten wir die theoretischen Möglichkeiten einer direkten Inhibition der untersuchten Enzyme durch den Kallikreinaktivator abzuschätzen. Aus den uns vorliegenden Befunden über Aufbau, Wirkungsweise und Hemmungsmechanismen glaubten wir folgern zu dürfen, daß eine Hemmwirkung auf eines der genannten Enzyme zwar wenig wahrscheinlich ist, jedoch mangels an Kenntnissen über Struktur und Aufbau des Kallikreinaktivators und der Fermente nicht generell ausgeschlossen werden darf. Letzteres gilt insbesondere für die alkalische Phosphatase.

# 5. SCHRIFTTUM

1. ABDERHALDEN, R. Alkalische und saure Phosphatase, in Klinische Enzymologie, G.Thieme Verlag, 1958, 53-78
2. ABUL-FADL, M.A.M. Acid phosphatases of Erythrocytes and Prostate  
KING, E.J. Biochem. J. 45 (1949), 51
3. ANAGNOSTOPOULOS, C. Action comparée de quelques Réactifs des fonctions amines sur diverses phosphatases acides et alcalines  
Biochem. et Biophys. Acta 4 (1950)
4. AKAMATSU, S. Coenzyme of Alkaline Phosphomonoesterase  
ASO, Y. Enzymologia 16 (1953), 231
5. ALBERS, H. Wesen und Wirkung der Fermente  
Ztschr. angew. Chem. 49 (1936), 448
6. ALBERS, H. Über die zusammengesetzte Natur der Fermente. 1. Mitteilg. zur Kenntnis der Phosphatasen  
BEYER, E. Ber. dtsh. chem. Gesellschaft 71  
BOHNEKAMP, A. (1938), 1913  
MÜLLER, G.
7. ATKINSON, W.B. Studies on endometrial alkaline phosphatase during the human menstrual cycle and in the hormon treated monkey  
ENGLE, E.T. Endocrinology 40 (1947), 327
8. AUBEL, F. Rôle de la perméabilité dans la respiration de E. Coli en presence des Hexosephosphates  
GRUNBERG, G.M. C.r.Acad.Sci. 228 (1949), 715  
MANAGO, M.  
SZULMAISTER, J.
9. AURICCHIO, G. Importanza dei gruppi aminici liberi per l'azione della fosfatasi acida  
BACCARI, V. Boll.soc.ital.biol.sper. 21 (1946) 49
10. BAMANN, E. Über die Aktivierung von Phosphatasen durch verschiedene Metalljonen  
HEUMÜLLER, E. Naturwissenschaften 28 (1940), 535
11. BAMANN, E. Über das Vorkommen einer zweiten im sauren Gebiet wirksamen Phosphatase in tierischen Organen  
SALZER Biochem.Z. 287 (1936), 381

12. BAMANN, E. Von einer pharmazeutischen Beobachtung zu neuartigen metallkatalytischen Reaktionen  
Deutsche Apothekerzeitung 97 (1957) 1103
13. BAYER (Leverkusen) Trasylol, Proteinaseinhibitor
14. BEET, A.E. Potassium Permanganate in the Kjeldahl Method for the Determination of Nitrogen in organic Substances  
Nature, 175 (1955), 513
15. BENZER, H. Zur Pathogenese der akuten postoperativen Parotitis  
Langenb.Arch.Klin.Chir. Bd. 297, H5, (1961), 445
16. BERTELLI, A. Schutz der Eigenhautüberpflanzungen mit Trasylol als Inaktivator der Proteolyse  
Int.Symp.Homotransplant. (1963)
17. BRAND, L. Structural Characteristics of Dehydrogenases  
EVERSE, J.  
KAPLAN, N.O. Biochem. J. 1 (1962), 423
- 18, CASTELLÁ, E. La fosfomonoesterasa ácida en el cobaya, conejo y rata  
An.Fac.Veterinaria Madrid, III-1951
19. CLOETENS Zur Konstitution der alkal. Phosphatasen  
Naturwissenschaften 28 (1940) 252  
Über den Aktivierungsmechanismus der alkal. Phosphatase II durch Metallionen  
Biochem. Z. 307, 352
20. COHN, R.O. Nature and Development of Lactic  
KAPLAN, N.O. Dehydrogenases  
LEVINE, L. Science. 136 (1962), 962  
ZWILLING, E.
21. COHEN, J.A. The active Site of Esterases  
OSTERBAAN, A. J. of Cellular and Comparative  
JANSZ Physiology 54 (1959), Suppl.S.231  
BERENDS, F.
22. COURTOIS, J.E. Hydrolases, osidases et enzymes  
PERLES, M. apparentés in: Traité de Biochimie  
Générale, Deuxième Fascicule: Les  
Enzymes  
Masson et Cie Editeurs, Paris 1964
- 22.A. COURTOIS, J.E. zitiert nach: COURTOIS u. PERLES  
ANAGNOSTOPOULOS, C. (22)

- 22 B. ROBERT, L.  
POLONOWSKI, J. Cinétique de la Réaction enzymatique in: Traité de Biochimie Générale (s. 22)
- 22 C. CINADER, B. Biochem. Soc. Symp. 10 (1953), 16  
zit. nach ROBERT u. POLONOWSKI  
(22 B)
23. DAVIES, D.R. The Phosphatase Activity of Spleen extract  
Biochem. J. 28 (1934), 529
24. DIRSCHERL, W.  
AMMON, R. Fermente, Hormone, Vitamine  
Thieme-Verlag, 3. Auflage 1959
25. DRÄGER,  
JUNG, G. Wirkung von Trasylol auf Endopeptidasen (unveröffentlicht)
26. FLEISCHHACKER, H.H.J. J. of Mental Sci. 84 (1939)
27. FORELL, M.M. Zur Frage der Entstehung des Kreislaufkollaps bei der akuten Pankreasnekrose  
Gastroenterologia 84 (1955), 225
28. FORELL, M.M. Zum Problem der Pankreatitis und Pankreatitistherapie  
Med. Klinik 19 (1962), 864
29. FREY, E.K.  
KRAUT, H. Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung  
Arch.exp.Path.u.Pharm. 133 (1928), 1
30. FREY, E.K. Der Kallikreinaktivator und seine klinische Anwendung  
Med. Klinik 57 (1962), 875
31. GIRARD, M. Einfluß der Therapie mit proteolytischen Antienzymen auf die Schübe einer chronischen Pankreatitis  
Lyon. méd. 207 (1962), 1299
32. GOLDMANN, R.D.  
KAPLAN, N.O.  
HALL, T.C. Lactic Dehydrogenases in Human Neoplastic Tissues  
Cancer Research, Vol. 24 No. 3 (1964)  
389
33. GOULD, B.S.J. The Action of "Alkaline" Phosphatase  
J. Biol. Chem. 156 (1944), 365
34. HUMMEL, J.P.  
KALNITSKY, G. Correlation of Structure and Catalysis in some selected Enzymes in: Annual Review of Biochemistry  
Vol. 33 (1964)
35. JACOBSEN, E. Klinik der Nierenphosphatase II  
Biochem. Z. 267 (1933), 101

36. JENNER, H.D.  
KAY, H.D. in: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Hand-  
buch der phys. und path. chem. Ana-  
lyse, Bd. 5, S. 176;  
Springer-Verlag 1953
- 37 A. JUNG, G.  
HELD, H. Über Fermente in der Follikel-  
flüssigkeit  
Arch. Gyn. 192 (1959)
- HELD, H. Inauguraldissertation, Tübingen 1960
- 37 B. JUNG, G.  
HASSAN, A. Zur Wirkung von Trasylol auf LAP.  
und GG. in Leber, Niere, u. Lunge des  
Meerschweinchens. (Unveröffentlicht)
38. KÄHLING, G. Der Einfluß von Ovarialhormon auf  
Enzyme endokriner Organe  
Inauguraldissertation, Tübingen 1964
39. KLASCHKA, F. Experimentelle und klinische Un-  
tersuchungen zur Wirksamkeit des  
Kallikrein-Trypsin-Inhibitors (Tra-  
sylol) bei Dermatosen  
Arch.klin.exp.Derm. 1 (1963), 71  
No. 217
40. KOCHAKIAN, C.D.  
FOX, R.P. The Effect of Castration and Testo-  
steron Propionate on the Alkaline  
and Acid Phosphatases of the Kid-  
ney, Liver and Intestine of the  
Mouse  
J.Biol.Chem. 153 (1944), 669
41. KOSŁOWSKI, L. Autointoxikation und ihre Behand-  
lung in der Chirurgie  
Dtsch.Med.Wochenschr. 86 (1961),  
992
42. KRAUT, H.  
FREY, E.K.  
BAUER, E. Über ein neues Kreislaufhormon  
Ztschr.phys.Chem. 175 (1928), 97
43. KRAUT, H.  
FREY, E.K.  
WERLE, E. Über den Nachweis und das Vorkom-  
men des Kallikreins im Blut  
Z.phys.Chem. 222 (1933), 73
44. KRAUT, H.  
KÖRBEI, W.  
SCHOLTEN, W.  
SCHULTZ, F. Versuche zur Isolierung des Kalli-  
kreininaktivators, III. Elektro-  
phoretische Reinigung und Moleku-  
largewichtsbestimmung in der Ult-  
razentrifuge  
Hoppe-Seyler's Z. phys. Chem. 321  
(1960), 90
45. KUTSCHER, W.  
SIEG, H. Über die Wirkungen der Phosphata-  
se  
Naturwissenschaften 37 (1950), 451

46. KUTSCHER, W.  
WÜST, H. Über die Fluoridhemmung der Phosphatase mit saurem pH-Optimum  
Biochem. Z. 310 (1941), 292
47. LANG, K.  
SIEBERT, G. Aufarbeitung von Geweben und Zellen in: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handb. der phys. und path. chem. Analyse; Bd. II/Teil 2, S. 537; Springer-Verlag 1955
48. LOHMANN, M.  
JENDRASSIK, L. Colorimetrische Phosphorsäurebestimmung im Muskelextrakt  
Biochem. Z. 178 (1926), 419
49. LONDON, M.  
HUDSON, B.P. Studies on the purification of acid prostatic phosphatase  
Arch.Biochem. 46 (1953), 141
50. LORBEEK, W. Zur Therapie der postoperativen Parotitis  
Klin. Med. H 12 (1961), 618
51. LUNDQUIST, F. Studies on the Biochemistry of Semen; some properties of prostatic Phosphatase  
Acta phys.scand. 14 (1947), 263
52. MARGGRAF, W. Beobachtungen über Fibrinolyse in der Chirurgie, ihre Prophylaxe und spezielle Behandlung mit Inhibitoren.  
Brun's Beitr.klin.Chir. Bd. 205, H2 (1962), 121
53. MARGGRAF, W. Untersuchung über die Brauchbarkeit verschiedener Stabilisatoren für kurzfristige Blutkonservierung  
Langenb.Arch.klin.Chir. 301 (1962), 691
54. MARKERT, C.L. in: Hereditary, Development and Immunologic Aspects of Kidney Disease  
J. Metcuff., Ed. (Northwestern United Press), Evanston III, 1962, S. 54
55. MARKERT, C.L. Lactate Dehydrogenases Isozymes: Dissociation and Recombination of Subunits Science 140 (1963), 1329
56. MAURER, W.  
et al. Klinische und experimentelle Ergebnisse zur Behandlung mit Trasylol  
II. Weltkongreß Gastroenterol. München 4 (1963), 134

57. MEISTER, A.                      Reduction of  $\alpha, \beta$ -Diketo and  $\alpha$ -Keto  
Acids Catalyzed by Muscle Prepara-  
tions and by Crystalline LDH  
J. Biol. Chem. 184 (1950), 117
58. MILOSEVIC, B.                    Antifermentbehandlung von akuter  
Pankreasnekrose  
Lijecn. Vjesn. 84 (1962), 143
59. MORTON, R.K.                    The group-transfer Activity of Cer-  
tain Hydrolytic Enzymes  
Discussion, Faraday Soc, 20 (1955)  
149
60. MÜLLER-WIELAND, K.            Die Beeinflussung der exkretori-  
schen Pankreasfunktion durch den  
Kalikreinaktivator  
Dtsch. Z. f. Verdauungs- u. Stoff-  
wechselerkrankungen Bd. 21, H 1  
(1961)
61. OBER, K.G.                      Die wechselnde Aktivität der alka-  
lischen Phosphatase im Endometrium  
und Ovar des mensuellen Zyklus so-  
wie im Myometrium unter der Geburt.  
Eine histochemische Darstellung.  
Klin. Wschr. 28 (1950), 9
62. OHLMEYER, P.                    Über Phosphatase  
Z. phys. Chem. 282 (1947), 1
63. OHLMEYER, P.                    Über Phosphatase  
Z. Naturforschung 1 (1946), 18
64. OHLMEYER, P.                    Experimentelle Bindung von Eiweiß-  
körpern an Zellkerne und Nuclein-  
säuren  
Z. Naturforsch. 4 b (1949), 263
65. PFLEIDERER, G.                   Lactatdehydrogenase, in: Hoppe-  
Seyler/Thierfelder, Handb. der  
phys. u. path. chem. Analyse;  
Bd. VI b/Teil A, Springer-Verlag 1965
66. PFLEIDERER, G.  
JECKEL, D.  
WIELAND, D.                    Über den Wirkungsmechanismus der  
Milchsäuredehydrogenase II  
Biochem. Z. 330 (1958), 296
67. PFLEIDERER, G.  
JECKEL, D.  
WIELAND, D.                    Bedeutung von SH-Gruppen für die  
enzymatische Aktivität. Studium an  
Milchsäuredehydrogenase aus Schwe-  
ineherz  
Arch. Biochem. 83 (1959), 275
68. PLAGEMANN, P.G.W.  
GREGORY, K.F.  
WROBLEWSKI, F.                    Distribution of LDH in Rabbit and  
Human Tissues  
J. Biol. Chem. 235, No. 8 (1960),  
2282

69. RICHTERICH, R.  
BURGER, A. Preferential Urea Inactivation of Electrophoretically slow migrating Lactic Dehydrogenases Isozymes Helv. Phys. Acta 21 (1963), 59
70. ROCHE, J.  
ABULD-FADL, M.A.M. Groupements aminés des phosphatases et activité enzymatique Bull.Soc.chim.biol. 30 (1948), 427
71. ROCHE, J.  
THOAI, N.V.  
DURAND, J. Bull. Soc. chim. biol. (Trav.) 25 (1943) zit. nach ROCHE und THOAI (72), Phosphatase Alkaline, in: Adv. in Enzymol. Vol.10 (1950),83
72. ROCHE, J.  
THOAI, N.V. Phosphatase Alkaline, in: Advances in Enzymology; Vol.10 (1950), 83
73. ROSENMUND, H. Untersuchungen über die saure Phosphataseaktivität Helv.Medica Acta, Suppl. 33; Beilage zu Vol. 20 (1953)
74. SAMEJIMA, N.  
et al. Experimentelle Untersuchungen über die Behandlung der akuten Pankreatitis mit Trasylol und klinische Erfahrungen Manuskript 1962
75. SCHRAMM, G.  
ARMBRUSTER, O. Reindarstellung der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm Z. Naturf. Bd. 9b (1954), 114
76. SCHWARTZ, J.H.  
CRESTFIELD, A.M.  
LIPMANN, F. The Amino Acid Sequence of a Tetradecapeptide containing the reactive Serine in E. Coli Alkaline Phosphatase Proc.Ntl.Acad.Sci.U.S.49 (1963),722
- 76 A. SCHWARTZ, J.H. The phosphorylation of Alkaline Phosphatase Proc.Ntl.Acad.Sci.U.S.49 (1963),871
- 76 B. SCHWARTZ, J.H.  
LIPMANN, F. Phosphate Incorporation into Alkaline Phosphatase of E. Coli Proc.Ntl.Acad.Sci.U.S.47 (1961),1996
77. SCHWERT, G.W.  
GLAID, A.J.  
WINER, A.D.  
NOVOA, W.B. Lactic Dehydrogenase: Inhibition by Oxamate and Oxalate J. biol. Chem. 234 (1959), 1143
78. SCHULTIS, K.  
RICK, W. Zur Beeinflussung der Pankreasfunktion beim Menschen durch Proteinaseinhibitionen Verhandl.d.Dtsch.Ges.Inn.Med. 70 (1964), 824

79. SCHULTZ, F. Über den Trypsin-Kallikreinaktivator und seine therapeutische Anwendung  
Arch.Pharm. 296 (1963), 125 No.7
80. SCHULTZ, F. Die Darstellung von kristallisiertem Kallikreinaktivator und kristallisiertem Inaktivator-Trypsin-Komplex  
KRAUT, H.  
BHARGAVA, N.  
Naturwissenschaften 50 (1963), 375
81. SIZER, J.W. The Action of Certain Oxidants and Reductants upon the Activity of Bovine Phosphatase  
J. Biol.Chem. 145 (1942), 405
82. STEICHELE, D.F. Klinik und Therapie der durch Fibrinolyse hervorgerufenen Blutungen  
HERSCHLEIN  
Med.Welt 3 (1962), 141
83. SULKIN, N.M. The acid and alkaline Phosphatase Activity in the normal and recovering liver of rat  
GARDNER, J.H.  
Anat. Record. 100 (1948), 143
84. TAMAYO, M.L. Coenzyme of Kidney Phosphatase  
MUNICIO, A.M.  
Nature 168 (1951), 249
85. WALSCH, O.F. Inhibition of the Hexosediphosphatase by Sulfhydryl-Reagents and by Ascorbin Acid  
WALSCH, G.  
Nature 161 (1948), 976
86. WEBB, E.C. The Action of Alkyl-Fluorophosphates on Esterase and other Enzymes  
Biochem. J. 42 (1948), 96
87. WERLE, E. Hemmung von Proteinasen durch den Kallikreinaktivator  
MAIER, L.  
RINGELMANN, R.  
Naturwissenschaften 39 (1952), 328
88. WERLE, E. Bestimmung des Kallikreinaktivators Trasylol (R) im Blut und in Organen und seine Verteilung nach Injektion  
TRAUTSCHOLD, I.  
Münch.Med.Wschr. 14 (1961), 773
89. WIELAND, T.H. Über die Verschiedenheit der LDH, III, Vergleiche der LDH aus verschiedenen Rattenorganen  
PFLEIDERER, G.  
ORTANDERL, F.  
Biochem. Z. 331 (1959)
90. WIELAND, T.H. Differenten und multiple Formen von Enzymen  
PFLEIDERER, G.  
Angew.Chem. 74 (1962), 261

## L e b e n s l a u f

Am 21. November 1942 wurde ich, Hans-Joachim Reimers, als der zweite Sohn des Ingenieurs Ernst Reimers und seiner Ehefrau Martha, geb. Jacobs, in Bonn am Rhein geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Bad Godesberg und Aachen sowie des Couven-Gymnasiums in Aachen und des neusprachlichen Zweigs des Gymnasiums in Kirchheim/Teck bestand ich im Frühjahr 1961 das Abitur. Im Sommersemester 1961 begann ich an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen das Studium der Medizin und legte dort im Oktober 1963 die ärztliche Vorprüfung ab. Nach einem zweisemestrigen Studienaufenthalt an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn kehrte ich an die Eberhard-Karls-Universität zurück. Im Februar 1967 habe ich das Medizinische Staatsexamen bestanden.



